

672

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES D'ORSAY
UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUE

PAR

Bernard CANTAU

Sujet de la Thèse :

**"Étude de la fraction oxydante de la
glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase de muscle de
lapin obtenue par hydrolyse chymotrypsique"**

SOUTENUE LE 19 DÉCEMBRE 1970, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

1	M. H. CLAUSER	:	PRÉSIDENT
4	M ^{ME} M. GRUNBERG-MANAGO	}	EXAMINATEURS
2	M ^{ELLE} J. YON		
3	M. R. DEDONDER		

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES D'ORSAY
UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUE

PAR

Bernard CANTAU

Sujet de la Thèse :

**"Étude de la fraction oxydante de la
glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase de muscle de
lapin obtenue par hydrolyse chymotrypsique"**

SOUTENUE LE 19 DÉCEMBRE 1970, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M. H. CLAUSER	:	PRÉSIDENT
M ^{ME} M. GRUNBERG-MANAGO	}	EXAMINATEURS
M ^{ELLE} J. YON		
M. R. DEDONDER		



Les recherches qui font l'objet du présent travail ont été effectuées sous la direction de M. Julio Pudlès, Maître de recherche au C. N. R. S. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour m'avoir permis, sous sa direction attentive, de travailler sur un sujet aussi intéressant, et de la bienveillance qu'il m'a témoignée.

J'adresse mes remerciements à Mme M. Grunberg-Manago, Directeur de recherche au C. N. R. S., Melle J. Yon, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences d'Orsay, M. H. Clauser, Professeur à la Faculté des Sciences d'Orsay, M. R. Dedonder, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, qui ont accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Je remercie Claude Brunel et Ginette Jaureguiberry, avec lesquels j'ai toujours eu beaucoup de plaisir à collaborer.

Je tiens à remercier tous mes collègues de l'amitié et de l'aide qu'ils m'ont apportées au cours de ce travail.

ABREVIATIONS

- GPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase
- G-3-P : D-glycéraldéhyde-3-phosphate
- D-gly : D-glycéraldéhyde
- Ac. P. : Acétyl phosphate
- NADH-X : mono hydro-nicotinamide adénine diphosponucléotide
- DTNB : Acide 5, 5' dithiobis (2-nitrobenzoïque)
- ATEE : N-Acétyl-L-tyrosine éthyl ester
- I. O. B. : acide o-iodosobenzoïque
- p-NPA : para-nitrophényl acétate
- D. F. P. : di-isopropyl fluorophosphate
- D. I. P-chymotrypsine : Diisopropyl-chymotrypsine
- TNBS : acide trinitrobenzène sulfonique
- NBS : n-bromosuccinimide
- DNS : 1-diméthylamino naphthalène 5-sulfonyl
- TEA : Triéthanolamine
- TRIS : Tris (hydroxyméthyl) amino-méthane
- NMN : Nicotine amide mononucléotide

INTRODUCTION

La glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase (D-glycéraldéhyde-3-phosphate NAD^+ oxydoréductase (phosphorylante) [E. C. 1. 2. 1. 12] est un enzyme de la glycolyse (tableau I) dont l'une des particularités les plus remarquables est d'introduire le phosphate minéral directement au niveau du substrat le glycéraldéhyde-3-phosphate. Par la suite le phosphate du phosphoglycérylphosphate est transféré sur l'ADP pour former l'ATP, en présence de phosphoglycérate kinase. Hess (1) a montré qu'in vivo, dans le système glycolytique, le contrôle de l'activité de la GPDH doit se faire essentiellement par l'intermédiaire des produits de la réaction, phosphoglycérylphosphate et NADH, tandis que l'ATP formé par la suite contrôle essentiellement le fonctionnement des kinases.

PROPRIETES GENERALES.

I - STRUCTURE, POIDS MOLECULAIRE, SOUS-UNITES.

Harrington et Karr (2) ont démontré par ultracentrifugation que les GPDH de muscle de lapin et de porc ont un poids moléculaire égal à 145.000 et qu'elles se dissocient en sous-unités de 36.300 en chlorure de guanidine 5 M.

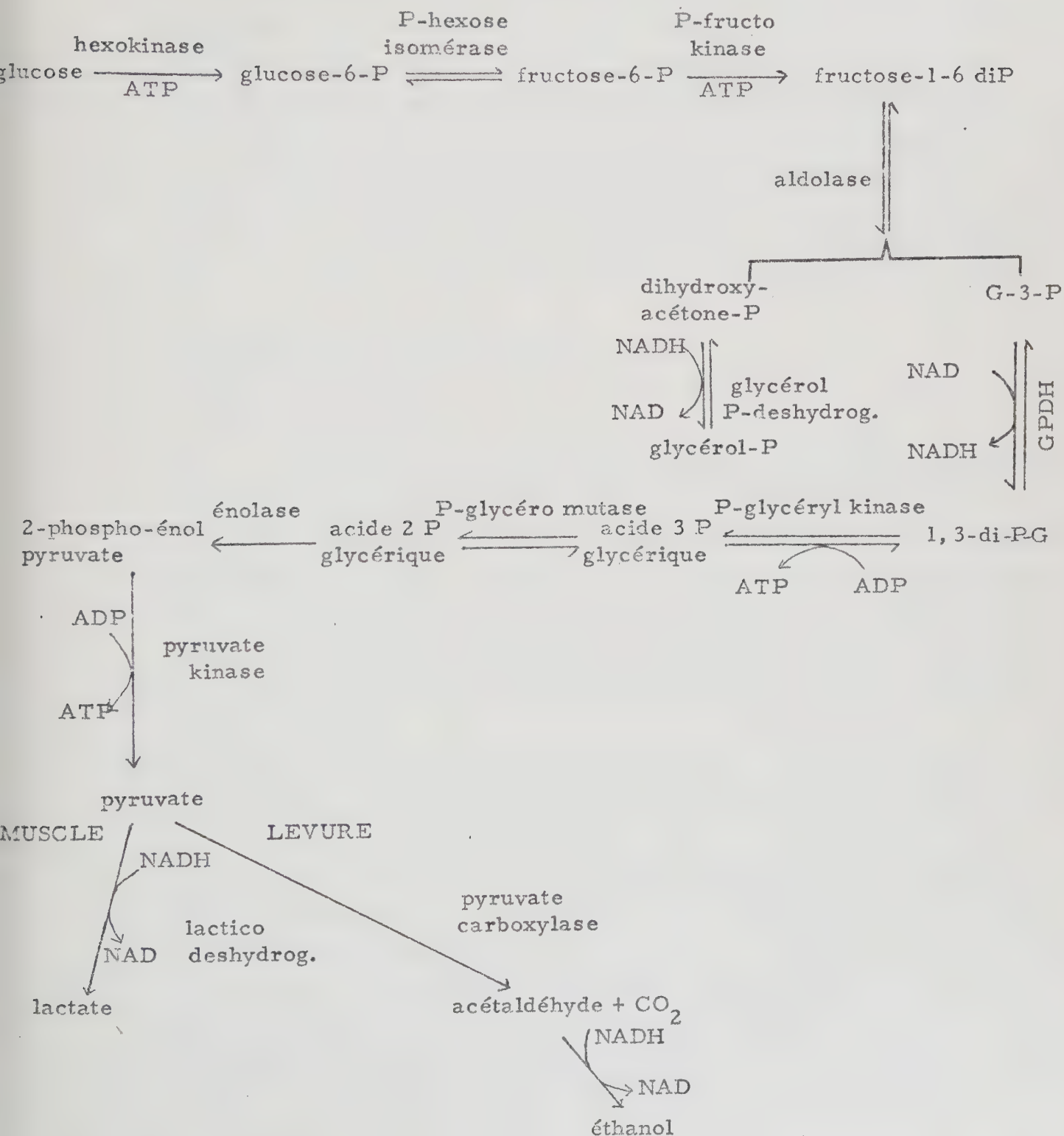
Récemment Davidson et al. (3) et Harris (4) ont déterminé la séquence des sous-unités des GPDH de langouste et de porc. L'enzyme des deux origines comporte quatre sous-unités identiques de poids moléculaire 36.000. De plus Allison et Kaplan (5) ont montré que les constantes de sédi-



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550217_0011

Tableau I : Schéma de la glycolyse (Embden-Meyerhof)



mentation des GPDH de muscle de lapin, de porc, d'homme, de poulet, de faisan, de flétan, d'esturgeon, de langouste, ainsi que celle de Escherichia coli et de levure sont très semblables. Tous ces résultats suggèrent que le poids moléculaire de ces GPDH est identique. Watson et Banaszack (6), par analyse cristallographique ont également démontré la structure tétramérique de la GPDH de langouste. D'autre part les GPDH d'origine différente dissociées en urée 8 M peuvent être réassociées par dilution et donnent lieu à la formation d'enzymes hybrides enzymatiquement actifs ; les zones d'association entre sous-unités sont donc très comparables dans les diverses GPDH (7).

II - ETUDE DU CENTRE ACTIF.

1) Rôle de la cystéine.

La réaction catalytique passe par un intermédiaire acyl-enzyme,
stable en absence d'un accepteur d'acyle tel que $\text{PO}_4^=$ ou $\text{AsO}_4^=$ (8, 9, 10).

L'argument le plus convaincant, concernant la présence d'un tel intermédiaire a été donné par Racker et Krimsky (11) qui ont isolé un acétyl enzyme formé à partir de l'acétyl phosphate et de la déshydrogénase ; ce complexe peut être réduit par le NADH pour fournir l'acétaldéhyde. Ce résultat les a conduit à postuler au cours de l'oxydation phosphorylante deux étapes essentielles et successives (12) :

l'acylation: $\text{E-NAD}^+ + \text{glycéraldéhyde-3-phosphate} \rightleftharpoons \text{3-P-glycéryl-E} + \text{NADH}$
et la phosphorylation: $\text{3-P-glycéryl-E} + \text{P}_i \rightleftharpoons \text{phosphoglycérylphosphate} + \text{E}$

La liaison acyl-enzyme a toutes les propriétés d'une liaison ester : elle est stable à pH 4, 5 ; elle est rompue par l'hydroxylamine pour donner l'acide hydroxamique correspondant. Divers auteurs (13, 14, 15) ont démontré l'importance des groupements sulfhydriles libres en observant que l'acétyl-phosphate diminue le nombre de groupements sulfhydriles dosables ; l'acide iodoacétique provoque le même effet et inhibe la réaction enzymatique (16, 17)

L'inhibition des GPDH de porc et de langouste par l'acide ^{14}C -iodoacétique provoque la formation de dérivés inactifs contenant 3,5 moles de cystéine carboxyméthylée par mole d'enzyme (18) ; de même l'acétylation de la GPDH en présence de p-nitrophényl acétate- ^{14}C permet d'isoler un intermédiaire acétyl enzyme marqué contenant 3 moles de cystéine acétylée par mole d'enzyme. La liaison acétyl enzyme est donc une liaison thioester. Le tableau II montre l'homologie des séquences peptidiques autour de la cystéine du centre actif (19) qui est située en position 149 dans les enzymes de queue de langouste, de levure, de muscle de lapin et de porc (4).

Tableau II : Séquences des peptides contenant la cystéine du centre actif de différentes trioses phosphate deshydrogénases.

Porc, lapin, poulet, huitre, esturgeon et levure

lys ile val ser asn ala ser cys thr thr asn cys leu ala pro leu ala lys

Homme

ile ile ser asn ala ser cys thr thr asn cys leu ala pro leu ala lys

Flétan

val val ser asn ala ser cys thr thr asn cys leu ala pro leu ala lys

Langouste

asp met thr val val ser asn ala ser cys thr thr asn cys leu ala pro val ala lys

Abeille

ile val ser asn ala ser cys thr thr asn cys leu ala pro leu ala lys

Crabe bleu

val val ser asn ala ser cys thr thr asn cys leu ala pro val ala lys

E. coli

tyr (glx asx gly) ile val ser asn ala ser cys thr thr asn cys leu...

... ala pro leu ala lys

2) Interaction NAD^+ -enzyme.

a/ Nombre de moles de NAD^+ lié par mole d'enzyme : Le nombre d'équivalents de NAD^+ liés à une mole de GPDH a été analysé par diverses méthodes.

- Par spectrophotométrie différentielle (20) il est possible de mesurer l'apparition d'une bande à 360 nm caractéristique de l'interaction NAD^+ -enzyme. Chance et J. H. Park (21), Kirschner et al. (22) observent une variation constante de l'absorbance du 1er au 4ème NAD^+ ajouté par mole de GPDH de levure, alors que dans l'enzyme de muscle de lapin ou de queue de langouste trois moles de NAD^+ seulement sont dosées (23, 24).

- Par l'émission de fluorescence à 340 nm pour une excitation à 290 nm on peut faire la même observation en mesurant la diminution de l'émission (quenching) en fonction du NAD^+ ajouté à l'apoenzyme. Velick dose ainsi 3 NAD^+ par mole d'enzyme de muscle de lapin (25), et Keleti en dose 3,5 dans l'enzyme de levure (26).

- Par dispersion rotatoire optique, Listowski et al. (27), Bolotina et al. (28) Jaenicke et Gratzner (29) ont montré l'influence du NAD^+ sur les constantes α , b_0 et l'apparition d'un effet Cotton dans la zone 270 nm à 300 nm (tableau IV).

- Enfin par équilibre de dialyse, Conway et Koshland (30), Koshland et Coolidge (31) démontrent la fixation de 4 NAD^+ par mole dans l'enzyme de levure et dans celui de muscle de lapin.

Dans toutes les GPDH étudiées jusqu'à maintenant, 4 moles de coenzyme peuvent se lier à une mole d'enzyme.

b/ Affinité du coenzyme : Les problèmes les plus souvent abordés concernent l'affinité du coenzyme pour la GPDH, et le rôle structural et catalytique des différents NAD^+ fixés.

Deux types de résultats ont été obtenus qui dépendent essentiellement de l'origine de la GPDH. Dans l'enzyme de levure, les études successives de Velick (32), Stockell (33), Kirschner *et al.* (34) puis Koshland et Cook (31), permettent de conclure que l'affinité NAD^+ -enzyme varie au maximum d'un facteur 10 entre le premier et le dernier NAD^+ fixé. Selon Kirschner *et al.* (27) les quatre sites NAD^+ -enzyme sont indépendants et égaux ; au contraire à la suite d'études de cinétiques rapides, Chance et Park (34) admettent la non équivalence des sites liant le NAD^+ à l'enzyme ; si tel est le cas on ne peut attribuer ces différences à la séquence en acides aminés des monomères puisque les quatre sous-unités sont identiques.

L'étude de l'enzyme de muscle de lapin a conduit à des résultats beaucoup plus cohérents : l'existence d'un phénomène de coopérativité négative au cours de la fixation du NAD^+ sur l'enzyme, mis en évidence en premier lieu par Conway et Koshland (30), est actuellement admise par tous les auteurs. On peut d'ailleurs voir dans le tableau III la valeur des constantes de dissociation NAD^+ -enzyme dans le cas des enzymes de muscle de lapin, et de queue de langouste.

Tableau III : Constantes de dissociation du NAD^+ lié à l' glyceraldéhyde-3 phosphate deshydrogénase.

Constante de dissociation	Langouste	Ultra- Lapin	
	(équilibre de dialyse)	centrifugation	(équilibre de dialyse)
K_1 (M)	$< 5.10^{-9}$	$< 10.10^{-8}$	$< 1.10^{-11}$
K_2 (M)	$< 5.10^{-9}$	$< 5.10^{-8}$	$< 1.10^{-9}$
K_3 (M)	6.10^{-7}	4.10^{-6}	3.10^{-7}
K_4 (M)	13.10^{-6}	35.10^{-6}	26.10^{-6}

Le tableau IV indique les valeurs des paramètres de dispersion rotatoire optique obtenus pour les GPDH de différentes origines. L'enzyme de levure dont l'affinité pour le coenzyme est la plus faible est également celui dont les constantes a_o et b_o sont le moins modifiées lorsque le NAD^+ est ajouté à l'apoenzyme.

Tableau IV : Dispersion rotatoire des GPDH de diverses origines.

Origine	pH		$-b_o$	$-a_o$	(m')	$\frac{-b_o}{630}$	(Holo-E - Apo-E)
Levure Benicke)(29)	7,4	Apo	142	238	3940	22,5 %	8,3 %
		Holo	195	190	3720	30,8 %	
Muscle de lapin Stowski et al.) (27)	7,4	Apo	145	245	3900	23 %	15 %
		Holo	240	140	3900	38 %	
Muscle de porc Lotina) (28)	8,5	Apo	114	279	-	18,1 %	15,3 %
		Holo	211	200	-	33,4 %	

c/ Site de fixation NAD^+ -enzyme.

La bande à 360 nm en absorbance a été mise en évidence par Racker et Krimsky (20), puis par Chance et al. (34, 35, 36), sur les GPDH de levure et de mammifère. Kosower (38) dans une étude sur les complexes de transfert de charge, a étudié des structures modèles du noyau pyrimidique et montré que l'on doit sans doute attribuer l'apparition de cette bande à un transfert de charge entre la cystéine du centre actif qui joue le rôle de donneur d'électron et le noyau nicotinamide du NAD^+ . Cette hypothèse est confirmée par la modification du groupement sulfhydryle de la cystéine du centre actif par différents réactifs (iodoacétate, p-chloromercuriobenzoate) ce qui entraîne la

disparition de la bande à 360 nm (37).

Cependant ce transfert de charge ne peut être à lui seul responsable de la liaison NAD^+ -enzyme : la première molécule de NAD^+ se lie rapidement à l'enzyme avec une variation d'énergie de liaison $\Delta G_0 = -10$ k. cal. L'énergie libre d'un transfert de charge ne peut dépasser -2 k. cal. (39).

Le NAD^+ peut également interagir avec la GPDH par l'intermédiaire du noyau adénylique ; cette éventualité a été confirmée dans l'enzyme de levure par les études de divers auteurs (40, 41, 42, 43),, ainsi que dans celui de muscle de lapin par Nagradova et al. (44), Sapag Hagar (45) et Polgär (46).

Des études fluorimétriques ont également suggéré une interaction possible entre le NAD^+ et un tryptophane ; la fluorescence de la protéine, qui est presque entièrement due à la présence de tryptophane, est abaissée par le NAD^+ ou le NADH, ce qui pourrait correspondre à un transfert direct d'énergie entre le noyau aromatique excité et le coenzyme.

Selon Velick (25) un transfert d'énergie doit réellement intervenir entre le NADH et un tryptophane de la GPDH ; cette fluorescence du NADH lié peut être due à l'excitation de la fluorescence du nucléotide par la lumière absorbée dans les noyaux aromatiques de la protéine. Dans le cas du NAD^+ , l'auteur est beaucoup plus réservé, car le NAD^+ n'absorbe pas et fluoresce très faiblement dans la zone de 340 nm. Par ailleurs, il n'est pas exclu que le phénomène de quenching ne traduise un changement de conformation de l'enzyme et d'environnement pour les tryptophanes.

III - FONCTIONS CATALYTIQUES.

L'un des caractères les plus remarquables de la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase est sa capacité de réaliser de très nombreuses fonctions catalytiques.

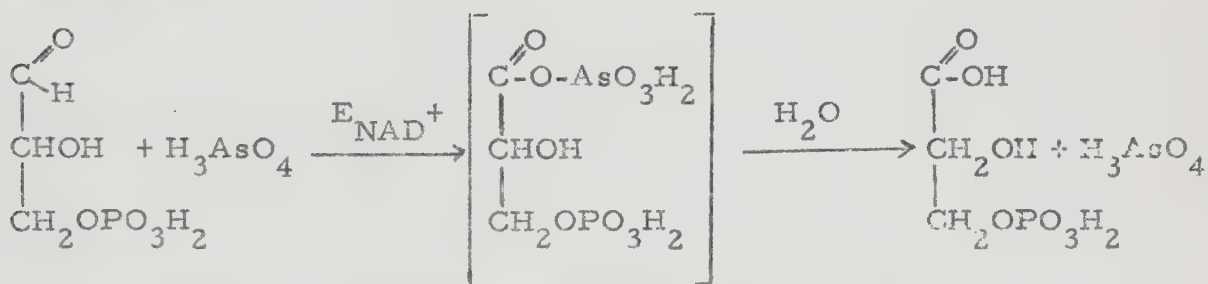
1) Oxydation phosphorylante.

Comme on l'a vu précédemment cette réaction fait intervenir un intermédiaire S-acyl-enzyme avec la réduction simultanée du coenzyme.

A - Différentes approches dans l'analyse de cette fonction.

1 - Transfert de l'acyle sur l'arsenate (activité arsenylante).

L'utilisation d'arsenate comme accepteur d'acyle au cours de la réaction d'oxydation phosphorylante au lieu de phosphate inorganique (20, 47) permet déplacer l'équilibre de la réaction vers la formation de NADH, de façon irréversible. Cette réaction passe par un intermédiaire acyl arseniate instable qui est hydrolysé spontanément pour donner de l'acide phosphoglycérique au cours de la réaction :



2 - Oxydation du substrat en présence de thioglycérol ou de PO_4^{---}

a/ Activité oxydante

On nomme activité oxydante l'activité transacylase lorsque l'accepteur d'acyle utilisé ne nécessite pas l'intervention du site de phosphorylation au cours de la désacylation de la GPDH. Krimsky et Racker (12) ont montré que les accepteurs d'acyle les plus intéressants sont le thioglycolate et l' α -monothioglycérol.

b/ Activité phosphorylante

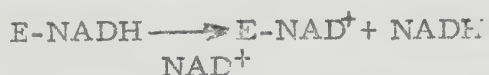
Si les conditions expérimentales de l'activité oxydante sont modifiées par la présence de P_i ajouté au milieu réactionnel, deux accepteurs d'acyle se trouvent en compétition pour réaliser la réaction de transacylation. Le P_i est

l' α -monothioglycérol. Dans ces conditions la GPDH native utilise le plus spécifique des deux accepteurs (P_i) ; la désacylation n'est plus le facteur limitant de la réaction et on n'observe qu'une seule vitesse au cours de l'essai enzymatique.

Cette activité est plus rapide que l'activité oxydante ; l'oxydation du D-glycéraldéhyde est "activée". Les auteurs précédents (12) déterminèrent "l'activité phosphorylante" après 5 minutes de réaction, par la mesure de la différence entre l'activité totale et l'activité oxydante (figure 1).

B - Intermédiaires essentiels et rôle du NAD^+ .

Au cours de l'oxydation phosphorylante, l'étape d'acylation se traduit par la formation d'un complexe ternaire $E \begin{smallmatrix} -NADH \\ -acyl \end{smallmatrix}$. Smith (48) a démontré que la désacylation a lieu en deux étapes successives : le transfert de l'acyle sur l'accepteur P_i précédant la libération du NADH lié à l'enzyme.



Selon Allison et al. (49) la réduction du NAD^+ est réalisée par un transfert direct d'hydrogène du substrat sur le coenzyme. Dans la réaction reverse au cours de laquelle le NADH est oxydé en présence de substrats tels que le phosphoglycérylphosphate et l'acétylphosphate (de Vijlder et al. (50)) l'enzyme doit être lié à 3 moles de NAD^+ pour atteindre une activité maximum. La fixation du quatrième NAD^+ inhibe la réaction ; ce résultat confirme très clairement l'hypothèse de Conway et Koshland (30) selon laquelle, dans le cas de l'enzyme de muscle de lapin, les deux premiers NAD fixés ont un rôle essentiellement conformationnel, tandis que la réaction catalytique fait intervenir presque uniquement une sous-unité.

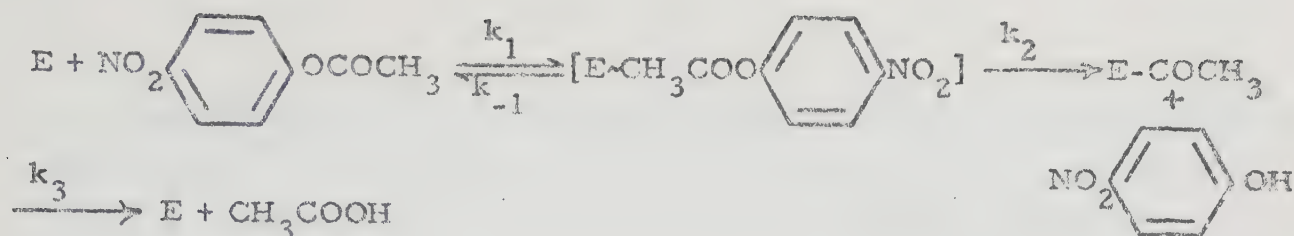
Par des mesures physico-chimiques (23, 27, 30) on est également amené à penser que la conformation optimale est atteinte lorsque 3 NAD^+ sont liés à l'enzyme de lapin, et que cette conformation est nécessaire à l'oxydation phosphorylante.

Teipel et Koshland (51) ont par ailleurs montré que si la formation du complexe binaire NAD^+ -enzyme est caractérisée par une coopérativité négative, au contraire dès que l'enzyme est lié à un NAD^+ par mole, les 4 groupements sulfhydriles actifs ont la même réactivité pour le substrat ; chaque mole de substrat lié à l'enzyme modifie faiblement la conformation de la sous-unité à laquelle il se lie sans changer celle des sous-unités voisines.

2) Activité estérasique.

L'activité estérasique consiste dans l'hydrolyse du p-nitrophényl acétate (p-NPA) en acide acétique et paranitro-phénol. Cette activité se produit dans la région du centre actif de la GPDH de muscle de lapin (52, 53) et de levure (54) car l'hydrolyse du p-NPA est inhibée par les substrats (D-glycéraldéhyde, glycéraldéhyde-3-phosphate, acétyl phosphate), par le coenzyme (NAD^+) ainsi que par les réactifs qui alcoylent (iodoacétate) ou oxydent les cystéines du centre catalytique (acide iodosobenzoïque) (55, 56, 57). Différents auteurs (58, 59) ont isolé un peptide contenant un S-acétyl formé lors de la réaction hydrolytique. Cette activité comme la réaction déshydrogénase comporte deux étapes essentielles, une acylation sur le groupement sulfhydrile du centre actif puis une désacylation.

Behme et Cordes (53) représentent schématiquement cette hydrolyse comme auparavant l'avaient fait Hartley et Kilby (60) dans le cas de l'hydrolyse du p-NPA par la chymotrypsine.



Le mécanisme de cette réaction a intéressé de nombreux auteurs, car l'utilisation de la cystéine du centre catalytique, et la mise en évidence de deux étapes fondamentales permettait de considérer l'analyse de la fonction estérasique comme une approche dans l'étude du mécanisme de l'oxydo-réduction de la GPDH.

Olson et Park (55) ont tout d'abord proposé pour cette hydrolyse l'intervention d'une histidine. La première étape est une attaque nucléophile de l'acétyl-ester, par le groupement sulfhydrile actif, conduisant à la formation d'un acétyl-thioester (acylation). La seconde étape est une hydrolyse de l'acétyl-thioester, produisant un intermédiaire N-acétyl-imidazole.

Cette hypothèse de travail a conduit plusieurs groupes à approfondir cette étude, soit en modifiant l'histidine, soit en utilisant des méthodes cinétiques.

Mathew et al. (57) et Halcomb et al. (61), Bond et al. (62) ont montré que la photooxydation des histidines inhibe uniquement la désacylation du S-acétyl-enzyme mais n'affecte pas l'acylation de la cystéine du centre actif.

Behme et Cordes (53) ont démontré dans le cas de l'enzyme de muscle de lapin que l'acylation dépend d'un groupe basique de $pK_a = 8,1$ et la désacylation d'un groupe similaire $pK_a = 8,7$; puis Lindquist et Cordes (54) avec l'enzyme de levure ont mis en évidence en comparant l'hydrolyse du p-NPA dans des tampons H_2O et D_2O que les variations de pK_a provoquées par le changement de milieu ne pouvait s'expliquer que par l'attaque non concertée

de la liaison ester par un groupement sulfhydrile sous la forme anionique. La désacylation se réaliserait par un mécanisme identique, ici Lindquist et Cordes (54) se fondent essentiellement sur le principe de "réversibilité microscopique" et sur le fait qu'ils n'ont pu mettre en évidence l'intervention d'aucun groupement nucléophile.

Ovadi et Keleti (63) enfin ont modifié les histidines de la GPDH de muscle de porc par le diéthylpyrocarbonate et montré que l'acétylation de 16 histidines par mole d'enzyme n'entraînait pas de disparition sensible d'activité estérasique, puisque selon les conditions il restait de 70 à 90 % d'activité estérasique.

Pour le moment donc, la seule évidence est le rôle joué par la cystéine du centre catalytique, tandis que le rôle de l'histidine dans le mécanisme de la réaction estérasique n'est toujours pas clair. Le NAD^+ est inhibiteur de la réaction (57).

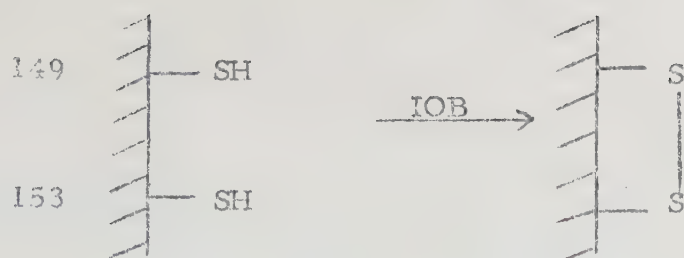
3) Activité phosphatasique.

L'activité phosphatasique consiste dans l'hydrolyse de l'acétylphosphate :

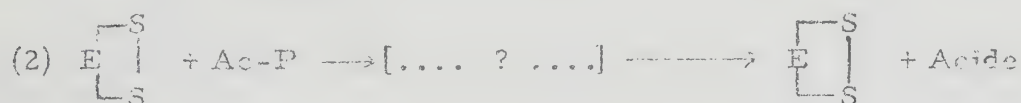


Cette réaction nécessite la présence de NAD^+ aussi bien dans le cas de l'enzyme de levure que dans celui de muscle (64, 65).

Jusqu'au travail de Ehrling et Colowick (65) on pensait que la GPDH possédait une activité acyl-phosphatasique, qui se trouvait augmentée lorsque l'acide iodosobenzoïque avait oxydé la cystéine du centre actif, entraînant aussi la formation d'un pont disulfure au niveau de chaque cystéine active.



Selon Ehrling et Colowick (65) si la plupart des auteurs ont trouvé une activité phosphatasique, dans l'enzyme natif, cela tient au fait que les préparations utilisées en général sont partiellement oxydées. En fait, Mathew et al., puis très récemment Davidson (66) ont montré que dans l'enzyme réduit, l'acétyl-phosphate peut former un acyl-enzyme en absence de NAD^+ . Il est vraisemblable de penser que l'hydrolyse de l'acétyl-phosphate peut passer par deux voies différentes : (a) si le groupement sulfhydrile de la cystéine du centre actif est réduit, on passe par un intermédiaire acyl-enzyme, (comme lors de l'hydrolyse du p-NPA) conduisant ensuite à l'acide libre, (b) si les cystéines de la GPDH sont oxydées selon (1) par l'acide o-iodosobenzoïque, l'activité est amplifiée d'un facteur 6 ; dans ce cas, on ne connaît pas la nature de l'intermédiaire (voir 2).



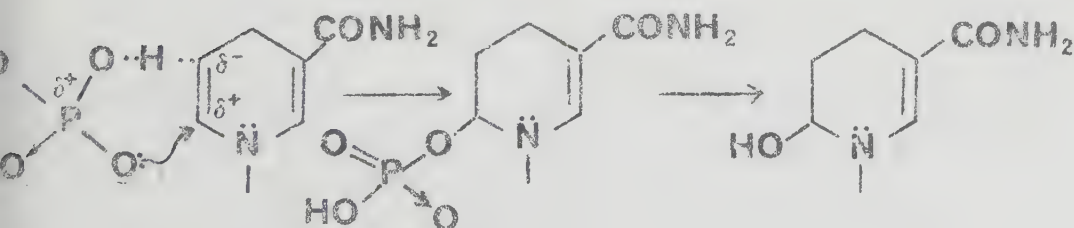
Dans notre laboratoire, Traore (67), modifiant les résidus lysine de la GPDH oxydée par l'acide iodosobenzoïque, a montré que la modification de six résidus entraîne la disparition de l'activité phosphatasique. Ehrling et Colowick (65) ont inhibé totalement cette activité par ioduration de l'enzyme ; ils n'ont pu mettre en évidence l'ioduration d'aucun groupement de la tyrosine. De même malgré l'inhibition de la fonction acyl-phosphatasique au cours d'une modification de l'enzyme oxydé par la N-bromosuccinimide, ils n'ont pas observé de diminution du nombre de tryptophanes dosés au cours de l'expérience.

4) Activité NADH-X.

Rafter et al. (68) ont mis en évidence que dans certains tampons contenant des anions (phosphate, arseniate, pyrophosphate, citrate, acétate) la GPDH catalyse la transformation du NADH en un composé appelé NADH-X ; lorsque cette réaction se produit, la bande d'absorption à 340 nm caractéristique du nicotinamide réduit disparaît, tandis qu'une bande de 290nm apparaît (69). Griffith et Chaplain (70), Barltrop et al. (71) avaient décrit la formation d'un composé phosphorylé "riche en énergie", dérivé du NADH, dont les propriétés spectrophotométriques sont celles du composé NADH-X. Cependant le NADH-X obtenu à partir de la GPDH n'est pas phosphorylé ; Rafter et al. (68) ont montré qu'au cours de la synthèse enzymatique du NADH-X le phosphate ou le pyrophosphate ne sont pas incorporés.

Alivisatos (72) en 1965 a entrepris l'étude des réactions spontanées du NADH avec les orthophosphates ; il a décrit les étapes intermédiaires de l'hydratation du noyau nicotinamide du NADH et relié ces résultats à la formation enzymatique de NADH-X.

La première réaction est une protonation rapide (73, 74) si la concentration en ions H^+ est importante (les anions acides favorisent cette réaction en milieu neutre [$PO_4H_2^-$, $H_2AsO_4^-$, $H_2PO_3^-$, $H_2P_2O_4^{--}$]). La vitesse de protonation dépend constamment de la concentration en acides, ce qui suggère une interaction NADH-acide mole à mole selon le schéma suivant :



Cette réaction peut continuer et donner lieu à la formation d'un dihydro-NADH ; cependant il semble que le NADH-X soit le dérivé monohydro-NADH. Si on admet ce mécanisme, le rôle essentiel de la GPDH doit être de faciliter le transfert de ce proton.

Le travail de Hilvers et al. (69) fait appel au même principe : la GPDH aurait un site de fixation des anions $E-X^+$ proche du nicotinamide du coenzyme. Ce site aurait pour rôle essentiel de capter les anions du milieu qui se trouveraient ainsi dans la position la plus favorable pour réaliser le transfert de protons. Cette réaction est activée par la présence de deux équivalents de NAD^+ par mole de GPDH et par l'acétyl phosphate, bien qu'il n'interviennent pas directement dans la réaction ; elle est inhibée par les réactifs alcoylant la cystéine du centre catalytique.

Deux autres propriétés catalytiques ont déjà été décrites :

- a) la transphosphorylation $ATP \longrightarrow IMP$ couplée avec l'oxydation des groupements sulfhydriles en disulfures dans l'enzyme (73),
- b) l'oxydation du NADH par l'enzyme traité auparavant par le 2-6-chlorophénol indophénol (74).

Ces deux dernières fonctions n'ont pas été étudiées depuis leur mise en évidence.

IV - TRANSFERT S $\longrightarrow$ N.

Lorsque la GPDH est acylée par le p-NPA ou l'acétyl-phosphate à pH 7,5 on dose de 3 à 4 liaisons acyl enzymes par mole ; à pH 8,5 on en dose de 6 à 7. Harris et Polgar (77) ont isolé après un marquage par le p-NPA radioactif deux peptides marqués, obtenus à la suite d'une hydrolyse pepsique : l'un contient la cystéine du centre actif, l'autre est acétylé sur une lysine ; ils ont pu marquer jusqu'à 2,9 moles de lysine par mole d'enzyme et ils estiment que l'enzyme actif possède 4 lysines réactives par mole. De plus, Mathew et al. (57) ont démontré que l'acyl lié à la cystéine active 149 est transféré à pH 8,5 sur la lysine 183 dans le muscle de lapin. Il y a donc un transfert S $\longrightarrow$ N.

La liaison N-acétyl enzyme est très stable et, par phosphorolyse ou arsénolyse, il n'est pas possible de réaliser la désacylation (57) : le transfert S $\longrightarrow$ N n'est pas réversible. Cette réaction démontre la très grande proximité de la cystéine du centre actif et de la lysine réactive.

V - CONCLUSION.

1) Acides aminés importants dans le mécanisme d'action de la GPDH.

Malgré les très nombreux travaux sur cet enzyme, on n'a que relativement peu de données sur la nature et le rôle des résidus amino acides du centre actif.

La cystéine 149 du centre actif est le site d'acylation du substrat sur la GPDH ; la lysine 183 réactive à pH 8,5 se trouve à proximité de la cystéine, mais on ne connaît pas son rôle ; l'histidine 38 semble être impliquée soit dans la réaction de désacylation, soit dans le maintien de la conformation "active" de la GPDH. Enfin la fixation du NAD^+ sur l'apoenzyme modifie les propriétés physico-chimiques des tryptophanes de la GPDH (O. R. D. fluorescence).

2) Analogies entre les fonctions catalytiques.

Le tableau V montre les analogies entre les fonctions transacylase et hydrolytique. La fonction phosphatasique de la GPDH oxydée par l'acide iodosobenzoïque ne passe pas par un intermédiaire Enz-S-Acyl.

3) Intérêt de l'étude de ces fonctions.

L'analyse de toutes ces fonctions est donc un moyen de mettre en évidence et d'étudier individuellement diverses parties de l'enzyme, proches, ou situées au niveau du centre actif. En effet :

a/ l'activité estérasique permet d'étudier la réactivité de la cystéine du centre actif ;

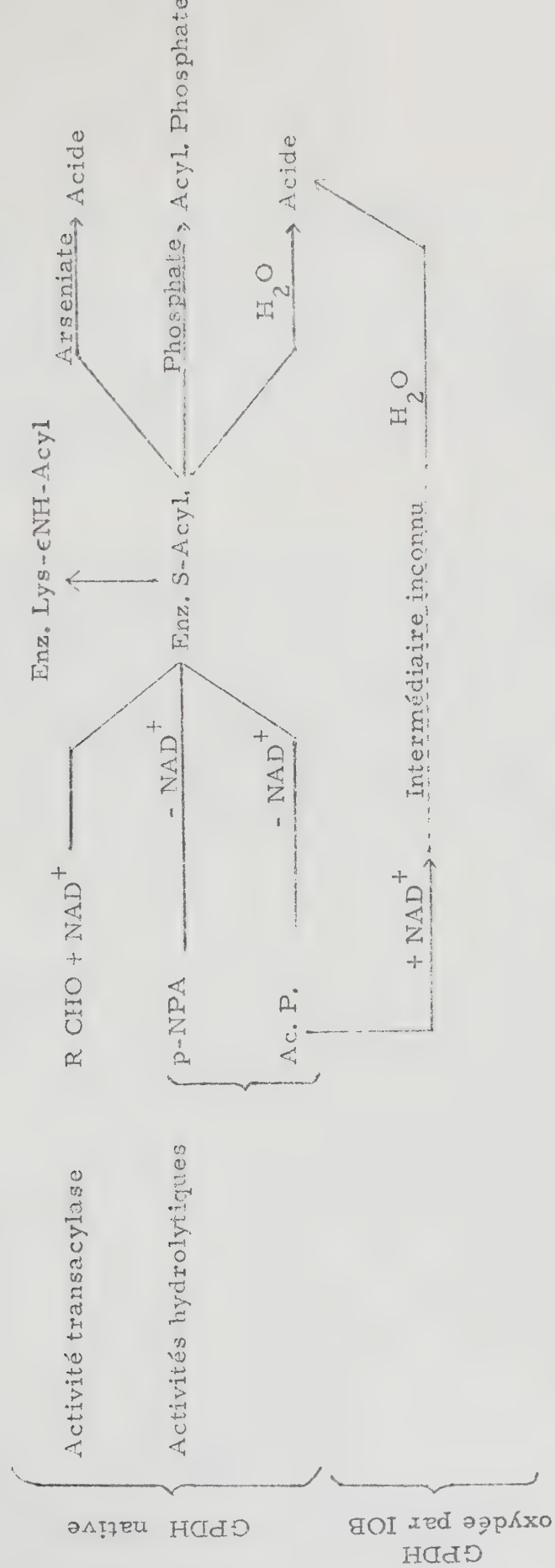
b/ les activités NADH-X et phosphatasique nécessitent la présence de deux moles de NAD^+ par mole d'enzyme comme l'activité deshydrogénase. De nombreux auteurs ont établi un lien entre la présence d'un site de phosphorylation et l'existence de ces fonctions ;

c/ l'étude de l'activité NADH-X permet également de préciser la nature de l'environnement du noyau nicotinamide du coenzyme.

d/ D'autre part Krimsky et Racker (12) dans une étude préliminaire ont démontré qu'il est possible sous l'action de la chymotrypsine de supprimer l'activité phosphorylante ; l'oxydoréduction persiste toujours, mais la désacylation de l'enzyme n'utilise plus de façon préférentielle des accepteurs d'acyle spécifiques (phosphate, arseniate). Le produit de la réaction n'est plus un acyl-phosphate, mais un acyl-thioglycérol. La réaction est irréversible, le phosphoglycéril phosphate n'est plus un substrat de la réaction :



Tableau V :



La phase la plus modifiée est la désacylation.

Les auteurs n'ont pas poursuivi ce travail au-delà de cette démonstration. Ils envisagent deux explications à la disparition de l'activité phosphorylante : ou bien la protéolyse de la GPDH entraîne l'élimination du site de phosphorylation, ou bien celui-ci n'est plus fonctionnel après l'action de l'enzyme protéolytique.

Nous avons trouvé dans cette modification de l'enzyme un moyen
particulièrement intéressant d'étudier le mécanisme d'action de la GPDH, car

a) elle permet d'isoler les réactions d'oxydoréduction et de phosphorylation
et d'observer s'il existe un lien entre les deux parties du centre actif concer-
nées et les diverses fonctions catalytiques ; b) l'étude d'une fraction oxydante
purifiée permet d'envisager sous un angle nouveau l'analyse des propriétés
de la GPDH (mécanisme de l'oxydoréduction, site de fixation du coenzyme).

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

MATERIEL

La glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase (E. C. 1. 2. 1. 12) et l'aldolase (E. C. 4. 1. 2. 13) ont été isolées à partir de muscle de lapin, le glycéraldéhyde-3-phosphate préparé selon la méthode de Beisenherz et al. (82). L' α -chymotrypsine (E. C. 3. 4. 4. 5) a été fournie par les laboratoires Choay (Lot 521) ou Worthington (Lot CDI 61. 378), la sérumalbumine bovine par Pentex, la pepsine (E. C. 3. 4. 4. 1) (2 crist. TRL 7 ED) et l'acétyl phosphate (Lot A. C. P. 65 A) par Worthington, le D. L-glycéraldéhyde par Fluka (Lot 49810), le diisopropyl fluorophosphate (Lot 54 B 7141) par K and K Laboratories.

Le paranitrophénylacétate, le N-acétyl-L-tyrosine éthylester (Lot 105 B 0370), le fructose 1-6 diphosphate (Lot 54 B 71. 41) et l'acide o-iodosobenzoïque proviennent de chez Sigma, l' α -monothioglycérol de chez Serlabo. L'acide 5, 5'-dithio-bis (2 nitrobenzoïque) (Lot 21. 820) et le 2-mercaptoéthanol ont été fournis par Aldrich Chem. Corp., la triéthanolamine et le Tris-(hydroxy méthyl) aminométhane par Merck, l'acide 2-4-6 trinitrobenzène sulfonique (Lot 9905) par Nutritional Biochemical Inc., l'AMP-5, le NMN, le NAD^+ , le NADH, et l'ATP par P. L. Biochemical Inc. Le phospho-glycérate (Lot 15. 745) et la phosphoglycérate kinase proviennent de Boehringer, la phosphocellulose de Macherey-Nägel et le Sephadex G 100 de Pharmacia. Tous les tampons ont été préparés avec de l'eau désionisée.

METHODES

I - PREPARATIONS

A - Phases essentielles de la préparation de la GPDH.

La GPDH a été préparée selon la méthode de Cori et al. (79) :

1) Broyage à froid des muscles squelettiques dans KOH 0,03 N + 2-mercaptoéthanol 0,001 M et extraction des protéines solubles pendant 30 minutes en chambre froide.

2) Centrifugation à 13.000 r.p.m. pendant 30 minutes dans une centrifugeuse Sorvall RC 2 B. Lavage des culots par KOH 0,03 M et nouvelle centrifugation. Le pH du surnageant est alors compris entre 6,5 et 6,8.

3) Précipitation fractionnée en présence de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7,4, EDTA 0,001 M Mercaptoéthanol 0,001 M.

a/ Le culot obtenu dans $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30 % est éliminé par centrifugation.

b/ Le surnageant est amené à 55 %. L'aldolase cristallise dans ces conditions, elle sera utilisée pour la préparation du glycéraldéhyde-3-phosphate. Le surnageant, après élimination du culot aldolase, contient la GPDH et la glycérophosphate deshydrogénase.

c/ On amène ce dernier surnageant à 66 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,4 ; la glycérophosphate deshydrogénase cristallise à ce pH ; le culot obtenu par centrifugation est éliminé ; la GPDH cristallise alors à pH 8,4, (point iso-électrique de la GPDH) en 48 heures.

4) Purification : la GPDH est centrifugée à 20.000 g, redissoute dans H_2O + EDTA 0,001 M + 2 mercaptoéthanol 0,001 M et amenée à 66 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7,4 pour se débarrasser des traces de glycérophosphate deshydrogénase. On amène le pH à 8,4 après cette élimination.

La GPDH est ainsi cristallisée 5 à 6 fois, elle peut être conservée pendant plusieurs mois dans ces conditions.

5) Critères de pureté.

L'analyse d'acides aminés donne la composition en acides aminés caractéristique de la GPDH ; par dansylation des $-NH_2$ terminaux (80) on dose 4 valines par mole. L'ultracentrifugation, dans une Synco modèle E, l'électrophorèse sur gel d'amidon et la chromatographie sur colonne de Séphadex G 100 donnent un seul pic homogène.

B - Préparation du glycéraldéhyde-3-phosphate (G-3-P).

Le G-3-P est formé selon la réaction :

Fructose-1-6-diphosphate $\longrightarrow$ D-G-3-P + Dihydroxyacétone phosphate

Cette réaction est catalysée par l'aldolase que nous avons isolée et purifiée selon la méthode de Taylor et al. (81) au cours de la préparation de la GPDH.

- Conditions expérimentales (82) :

a/ Incubation : 384 mg de fructose-1-6-diphosphate sont dissous dans 10 ml EDTA 0,001 M ; cette solution est ajoutée à 40 mg d'aldolase, 10 ml de tampon CO_3HNa (16,8 g/l)-EDTA (pH 8,0) et 10 ml de sulfate d'hydrazine (0,130 g/l). Ce mélange est incubé pendant 30 minutes à 40°.

Puis on ajoute au milieu réactionnel 40 mg d'aldolase et 10 ml de sulfate d'hydrazine, et on fait une nouvelle incubation de 30 mn à 40°.

Le sulfate d'hydrazine, réagissant avec la fonction aldéhydique du G-3-P pour donner une hydrazone, déplace constamment l'équilibre vers la formation de triose phosphate.

b/ Elimination de l'aldolase et du sulfate d'hydrazine : L'aldolase est précipitée par 2 ml HClO_4 65 % à 0° et éliminée par centrifugation. Le surnageant est neutralisé par KOH 2 N, on sépare le sel insoluble formé (KClO_4) par décantation.

Le sulfate d'hydrazine est extrait trois fois par 20 ml de benzaldéhyde. Puis le benzaldéhyde saturant le milieu aqueux est éliminé par trois extractions à l'éther éthylique. Enfin l'éther éthylique saturant le milieu aqueux est évaporé.

c/ Détermination de la concentration en substrat : la solution contient alors le G-3-P dont la concentration est déterminée par un test arsenylant où le substrat est en quantité limitante ; le NADH formé pendant la réaction menée jusqu'à l'utilisation complète du G-3-P, permet de déterminer la concentration en substrat en utilisant la relation :

$$C = \frac{O.D^{340 \text{ nm}}}{2,07} \times f. \text{ dilution}$$

Le rendement de cette préparation est compris entre 85 et 90 %.

C - Préparation de l'apoenzyme.

La GPDH cristallisée 4 à 6 fois est centrifugée à 20.000 g avec une centrifugeuse Sorvall RC 2 B . Le culot, dissous dans un tampon Tris ou triéthanolamine 0,05 M-EDTA 0,001 M (pH 7, 9) selon les expériences, a été dialysé contre le tampon pour éliminer le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

La protéolyse est très sensible à la présence de faibles quantités de NAD^+ , comme on le verra plus loin. Il est donc nécessaire d'éliminer tout le NAD^+ lié à la GPDH. La seule méthode permettant une élimination complète est le passage de l'holoenzyme sur une colonne de charbon actif Norit A, qui retient par adsorption, le nucléotide. Le Norit A, avant usage est lavé par

HCl N, puis H_2O et EDTA 0,001 M (pH 7) (12). Deux types de colonnes ont été utilisées :

a/Selon Fox et Dandliker (83).

1,25 g de charbon et 1,25 mg de papier Whatman broyé sont mélangés et placés sur une colonne de 1 x 20 cm de débit 8 ml à 10 ml/heure. On peut éliminer le NAD^+ lié à 150 mg d'enzyme à une concentration de 30 mg/ml.

b/Selon Krimsky et Racker (12).

Une colonne de Norit A (2,5 x 1 cm) est tassée. Le débit (10 ml/heure) régulier est assuré par un écoulement sous pression d'air comprimé ; on peut ainsi éliminer le NAD^+ lié à 100 mg de GPDH. Celle-ci est déposée sur la colonne à une concentration de 30 à 50 mg/ml.

Ces deux techniques permettent de réduire au maximum le temps de contact entre l'enzyme et le charbon, et de limiter la dégradation éventuelle de la GPDH au cours du traitement.

Lorsque la protéolyse chymotrypsique a lieu en présence d'AMP, nous avons légèrement modifié cette méthode : après une première élimination de NAD^+ , environ 0,2 équivalents de coenzyme sont encore liés à la GPDH. ajoutant 30 équivalents d'AMP par équivalent de NAD^+ on déplace le NAD^+ (voir les résultats). Puis un traitement de 20 minutes à 0° en présence de 40 mg de Norit pour 100 mg d'enzyme permet d'éliminer les nucléotides. Cette préparation contient alors essentiellement des traces d'AMP, tandis que le NAD^+ est totalement éliminé.

Au cours de ce traitement, le rapport d'absorbance 280 nm/260 nm est passé de 1,08 à 1,90 en moyenne. La concentration en protéine a été déterminée en utilisant les coefficients calculés par Fox et Dandliker (83) :

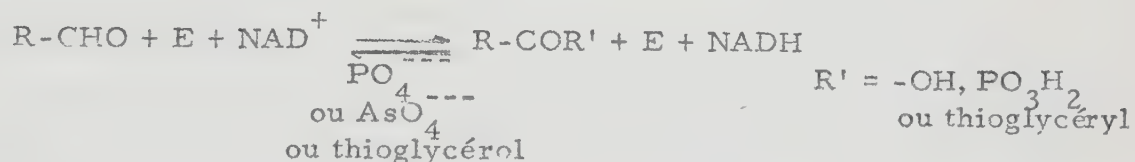
$E_{1\%}^{280\text{ nm}}$ Holoenzyme = 10, $E_{1\%}^{280\text{ nm}}$ Apoenzyme = 8,29. Ce qui correspond à des ϵ_M respectifs de $14,4 \cdot 10^4$ et $11,5 \cdot 10^4$.

Le passage sur Norit ne diminue pas l'activité spécifique de l'enzyme : celle-ci est de 130 $\mu\text{moles NADH}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine, au cours d'un test arsénolytique (pH 7, 9). Cependant, la GPDH après ce traitement est beaucoup plus fragile que l'holoenzyme, et ne peut être conservée pendant plus de 48 h. Du fait de cette instabilité, l'élimination du NAD^+ a été faite juste avant l'hydrolyse chymotrypsique.

II - METHODES ENZYMATIQUES.

A - Tests enzymatiques des réactions de transacylation.

Les réactions de transacylation se traduisent essentiellement par la formation de NADH, et par l'oxydation de l'aldéhyde utilisé comme substrat.



La mesure de l'activité enzymatique peut être suivie par la formation de l'un des produits, le NADH. Nous avons utilisé au cours de ce travail deux substrats le D-glycéraldéhyde et le D-glycéraldéhyde-3-phosphate.

1) Activité arsenylante, ou transfert d'acyle sur l'arseniate.

- Conditions expérimentales : Les tests ont lieu dans 3 ml final de tampon triéthanolamine 0,05 M EDTA 0,001 M (tampon TEA-EDTA), à pH 7, 9. On utilise 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de GPDH $1,38 \cdot 10^{-3}$ M NAD^+ , $2,79 \cdot 10^{-3}$ M glycéraldéhyde-3-phosphate et $1,2 \cdot 10^{-2}$ M arseniate sont ajoutés pour initier la réaction. La

vitesse de réaction est sensiblement constante pendant 45 secondes. La mesure a lieu à 340 nm ; elle n'est précise que si entre 15 et 45 secondes la variation d'absorbance est inférieure ou égale à 0,150 (figure 1). Les lectures ont été faites avec un spectrophotomètre Zeiss PMQ 2.

2) Activités oxydante et phosphorylante.

- Conditions expérimentales :

a/ Activité oxydante : Le test a lieu à température ordinaire, dans un tampon [TEA-EDTA], pH 7, 9 en présence de 2,55 μ M GPDH, $1,4 \cdot 10^{-3}$ M NAD^+ , $6,1 \cdot 10^{-4}$ M α -monothioglycérol et $22 \cdot 10^{-3}$ M D-glycéraldéhyde dans un volume final de 1 ml. Le D-glycéraldéhyde est ajouté en dernier lieu pour initier la réaction. La réaction est suivie pendant 5 minutes (figure 1).

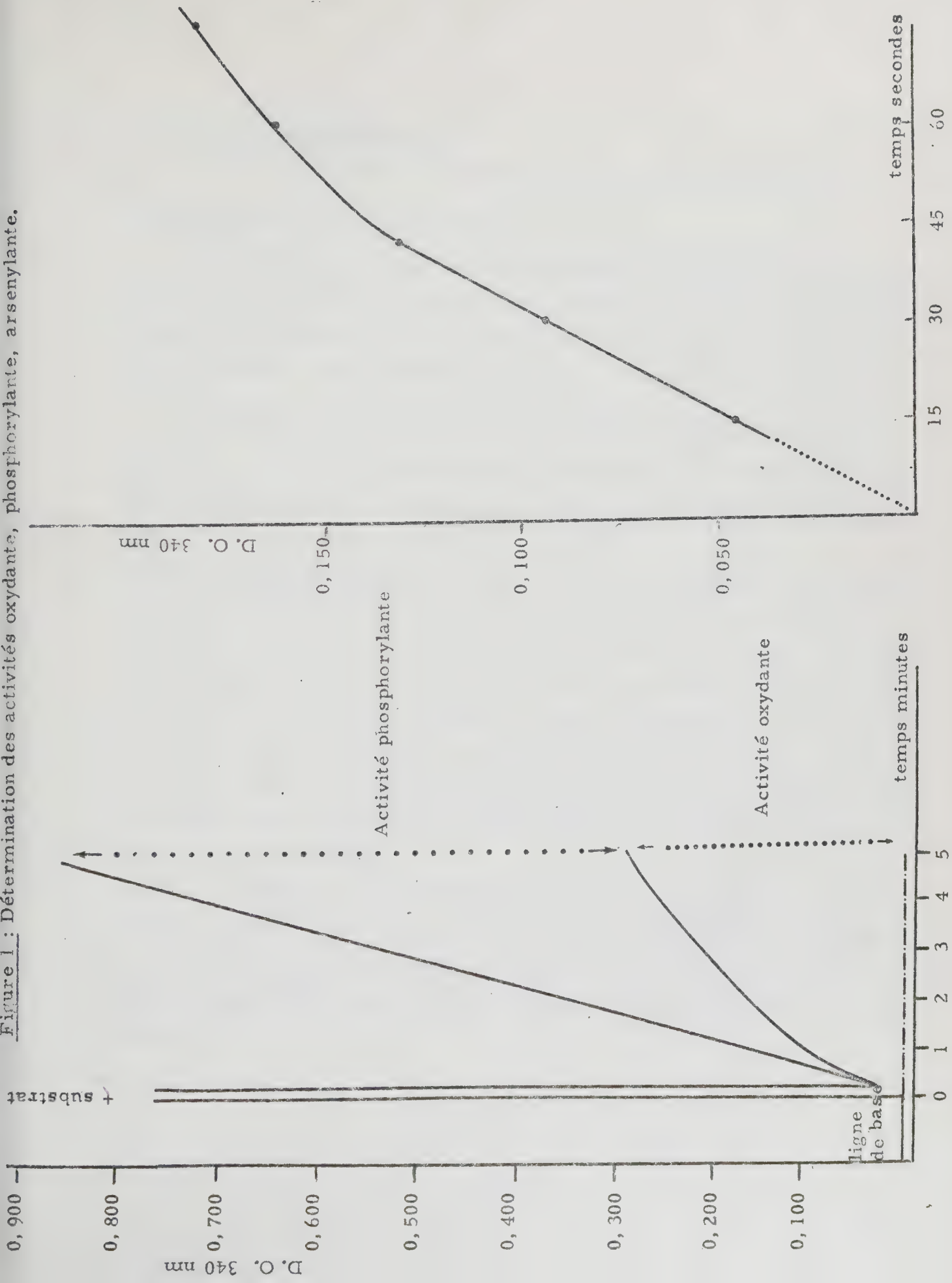
b/ Activité phosphorylante : Les conditions expérimentales sont celles de l'activité oxydante ; néanmoins, on ajoute $\text{PO}_4^{---} 1 \cdot 10^{-2}$ M à l'essai enzymatique. On mesure l'activation par le phosphate après 5 mn (12) (voir figure 1).

B - Activité estérasique.

L'hydrolyse du p-NPA est mesurée selon la méthode de Park et al. (52) à pH 8,0. Au dessus de ce pH l'hydrolyse spontanée devient trop importante et rend plus complexe la mesure de l'activité (62).

- Conditions expérimentales : Le test a lieu à 25°, dans 1 ml final à pH 8,0 en présence de 200 à 300 μ g enzyme et $1 \cdot 10^{-3}$ M p-NPA. La variation d'absorbance est mesurée à 400 nm.

Figure 1 : Détermination des activités oxydante, phosphorylante, arsenylante.



C - Activité phosphatasique.

Cette activité a été mesurée par deux méthodes différentes :

1) Hydrolyse de l'acétyl phosphate :

a/ Incubation : 8,4 nmoles/ml d'apoenzyme en présence de 2 équivalents de NAD^+ par mole de GPDH et de 0,016 mmoles d'acétyl-phosphate, dans un tampon [TEA-EDTA] (pH 8,0) sont placés à 30° pendant 90 minutes. Simultanément un témoin acétyl phosphate sans enzyme est traité de la même façon.

b/ Dosage de la liaison ester par la méthode des hydroxamates (84).

Principe : Les dérivés O-Acyl (esters, anhydrides) réagissent avec l'hydroxylamine à pH alcalin et forment des dérivés de l'acide hydroxamique qui donnent des complexes brun pourpre avec Fe^{+++} .

Conditions expérimentales : On ajoute au milieu de la réaction 1 ml de chlorhydrate d'hydroxylamine 2 M (préparé au dernier moment par addition de 2 volumes égaux de NH_2OH 4 M et de NaOH 3,5 M et protégé de la lumière), 1 ml de tampon acétate 0,1 M, pH 5,4. On fait une nouvelle incubation à 30° pendant 10 minutes pendant laquelle se forme l'hydroxamate. Celui-ci est alors révélé par les ions Fe^{+++} de la façon suivante : on ajoute 1 ml HCl 9 % 1 ml TCA 12 %, 1 ml FeCl_3 0,37 M dissous dans HCl 0,1 M. Les protéines précipitées sont éliminées par centrifugation puis l'absorbance à 540 nm est lue au spectrophotomètre.

Ce dosage permet de déterminer 1) la concentration en acétyl-phosphate au temps 0 min de la réaction, 2) la concentration en substrat à la fin de l'incubation, 3) l'hydrolyse spontanée dans ces conditions expérimentales. On déduit par différence la quantité d'acétyl-phosphate hydrolysé enzymatiquement :

[Ac. P.] hydrolysée enzymatiquement = [Ac. P.] initiale - [[Ac. P.] hydrolyse effectuée] + [Ac. P.] finale].

2) Hydrolyse du 1-3-diphosphoglycérate.

L'incubation comporte deux étapes :

a/ Formation d'acide 1-3-diphosphoglycérique à partir de l'acide 3-phosphoglycérique en présence de 3-phosphoglycérate kinase (voir le schéma de la glycolyse). On incube pendant 10 minutes à température ambiante dans un volume de 1 ml final de tampon imidazole $5 \cdot 10^{-2}$ M, EDTA 10^{-3} M (pH 7) contenant 5 μ M ATP, 6,35 μ M de 3-phosphoglycérate, 4,9 μ M $MgCl_2$, 0,55 μ M NAD^+ et 20 μ g de phosphoglycérate kinase.

b/ Hydrolyse de l'acide 1-3-diphosphoglycérique formé. La réaction a lieu en présence de 100 à 150 μ g de GPDH à température ambiante, pendant 5 mn.

Le dosage du phosphate libéré est fait par la méthode de Berenblum et Chain (85). Dans une ampoule à décantation on verse la solution à doser (2 ml) complétée à 7 ml par H_2O , 0,2 ml de SO_4H_2 concentré, 2,5 ml d'acide molybdate d'ammonium 2,5 %, 8 ml d'isobutanol. On extrait l'acide phosphomolybdique formé, par l'isobutanol en agitant l'ampoule pendant 30 secondes. La phase aqueuse est éliminée par décantation. On lave deux fois avec 5 ml de H_2SO_4N pendant 15 secondes, la phase inférieure étant éliminée à chaque étape. On transfère la phase supérieure dans un tube gradué en rinçant l'ampoule avec de l'éthanol 95 %. Le volume est ajusté à 10 ml avec de l'éthanol. Au moment du dosage on réduit le complexe phosphomolybdique avec 0,1 ml d'une solution de $SnCl_2$ (40 g dans 100 ml HCl concentré). Un blanc et une gamme sont dosés dans les mêmes conditions.

D - Activité NADH-X.

- Conditions expérimentales : Les incubations ont lieu à 25° dans 1 ml de tampon pyrophosphate de sodium (pH 7,0) 0,05 M. EDTA 0,001 M, contenant entre 0,150 et 1 mg/ml de GPDH, 2 équivalents de NAD^+ par mole d'enzyme de l'acétyl-phosphate $5,4 \cdot 10^{-3}$ M. La réaction est initiée par 10 μl NADH 10^{-3} M. La formation de NADH-X est mesurée par la diminution d'absorbance à 340 nm (69).

E - Détermination des constantes cinétiques d'une réaction enzymatique :

Principe : Henri (86), puis Michaelis et Menten (87) ont postulé qu'une réaction enzymatique doit passer par la formation d'un complexe intermédiaire, enzyme-substrat. La réaction peut être représentée selon le schéma général :



où E représente l'enzyme, S le substrat, P le produit de la réaction et ES le complexe intermédiaire enzyme-substrat. A partir de cette réaction peut être définie la vitesse initiale de la réaction V_0 à l'état stationnaire, où $\frac{d\text{ES}}{dt} = 0$

$$V_0 = \frac{\frac{k_2 \text{E}_T \text{S}}{k_{-1} + k_2}}{k_1} + \text{S} = \frac{V_m}{1 + \frac{K_m}{\text{S}}}$$

On définit ainsi V_m = vitesse maximum de la réaction lorsque

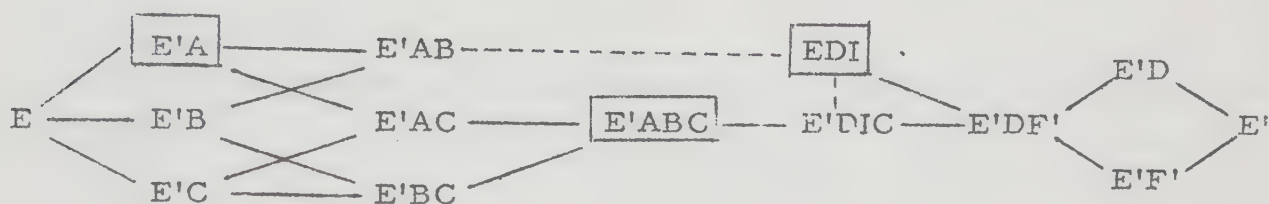
$$\text{S} = \infty \quad \text{et} \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_D + k_2$$

K_D = constante de dissociation du complexe intermédiaire enzyme-substrat.

En fait il s'agit là de l'expression la plus simple, d'une réaction

enzymatique, et V_m et K_m dans de nombreux cas représentent des valeurs beaucoup plus complexes.

Ainsi Furfine et Velick (88) dans le cas de l'oxydation phosphorylée de la GPDH ont proposé un schéma dans lequel ils tentent de tenir compte des diverses voies possibles pour parvenir à la formation du complexe enzyme-substrat :



A, B, C sont respectivement NAD^+ , aldéhyde et phosphate ou arseniate.

D, F', E' et I sont respectivement NADH, acylphosphate, enzyme et acyl lié à l'enzyme.

E'ABC représente le complexe de Michaelis non covalent.

E'DI est le complexe acyl-enzyme NADH que l'on ne décèle qu'en l'absence de l'accepteur d'acyle.

E'DIC est le complexe quaternaire correspondant à E'DI.

L'on retrouve ici un cas particulier dans lequel le complexe enzyme-substrat peut se faire selon plusieurs voies.

K_m dépend alors des proportions relatives des différents complexes susceptibles d'être formés.

Détermination des constantes de Michaelis et Menten : La détermination de K_m a été faite selon la représentation de Lineweaver et Burk (88) en portant l'inverse de la vitesse initiale de la réaction en fonction de l'inverse de la concentration en substrat. L'intersection à l'ordonnée et à l'abscisse donnant

les valeurs $\frac{1}{V_m}$ et $-\frac{1}{K_m}$.

Détermination des constantes d'inhibition : La détermination de K_i a été faite selon Velick et Hayes (9) en portant l'inverse de la vitesse de réaction en fonction de l'inverse de la concentration en substrat. On obtient une droite dont le point d'intersection correspond à $-\frac{1}{K_m} (1 + \frac{i}{K_i})$ dans le cas d'une inhibition compétitive.

i et K_i sont respectivement la concentration en inhibiteur et la constante d'inhibition.

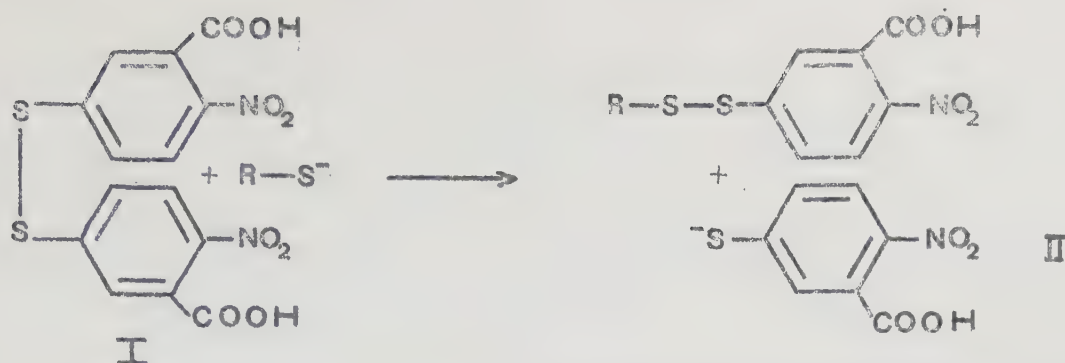
III - METHODES CHIMIQUES.

Les concentrations en protéines ont été déterminées soit par la méthode de Lowry avec un spectrophotomètre Zeiss PMQ 2 à 660 nm soit sur la base de $E_{1\text{ cm}}^{280\text{ nm}} = 10$ (5).

1) Modifications des groupements sulfhydriles.

a/ par l'acide dithiobis-nitrobenzoïque (DTNB) (I) (Méthode d'Ellman (89) modifiée par Butterworth et al. (90)).

L'acide dithiobis-nitrobenzoïque réagit avec les composés thiols aliphatiques à pH 8,0 en libérant une mole d'acide p-nitrothiobenzoïque (II) ; le produit II très coloré ($\epsilon_M = 13.600$ à 412 nm) permet de suivre le dosage des groupements thiols (89).

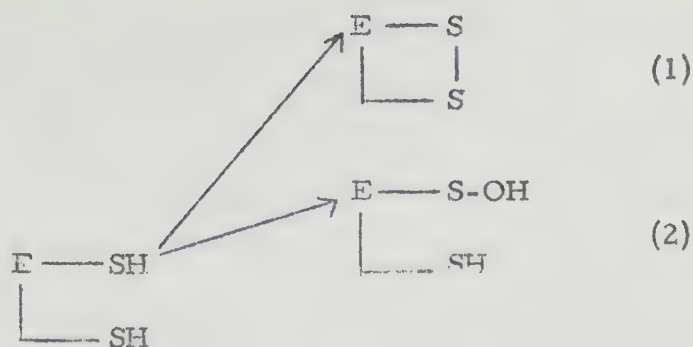


- Conditions expérimentales : Le dosage a lieu dans un volume de 1 ml final en présence d'environ 0,300 mg d'enzyme. La réaction est réalisée en présence de 100 μ l de DTNB 0,8 mg/ml. On utilise pour déterminer le nombre de groupements sulfhydriles dosés soit l' ϵ_M de l'acide p-nitrothiobenzoïque soit une gamme de glutathion. On peut faire ce dosage également dans un milieu chlorure de guanidine 5 M final et doser rapidement la totalité des groupements sulfhydriles.

b/ par l'acide o-iodosobenzoïque.

Synthétisé pour la première fois par Meyer et Wachter (91), l'acide o-iodosobenzoïque parce qu'il est très spécifique, est un agent oxydant couramment utilisé pour modifier les groupements sulfhydriles de la GPDH. Le type d'oxydation que ce réactif peut provoquer sur l'enzyme a été en particulier analysé par Parker et Allison (92) ainsi que par Ehrling et Colowick (65).

L'inhibition n'est pas due à la formation d'un complexe inhibiteur entre la GPDH et l'acide o-iodosobenzoïque (92). Ils envisagent deux possibilités d'oxydation de l'enzyme : 1) formation d'un pont disulfure, 2) formation d'un acide sulfénique au niveau de la cystéine du centre actif. Ils sont en faveur de la deuxième possibilité ainsi que Ehrling et Colowick.



Cette inactivation est réversible (93) par traitement de l'enzyme avec le 2-mercaptoéthanol. Toutefois, il faut noter que la réaction de 3 moles d'IOB par mole d'enzyme entraîne la disparition de 6 groupements -SH (55), ce qui est fortement en faveur de la formation d'un pont disulfure au cours de la réaction.

- Conditions expérimentales : On ajoute à l'enzyme natif, ou à la fraction oxydante 5 équivalents d'acide o-iodosobenzoïque (dissous à pH neutre, 1 mg/ml). La réaction d'oxydation des groupes sulfhydriles a lieu à 20°, pendant 60 minutes. L'enzyme est réactivé par le 2-mercaptoéthanol 0,1 M final. La réaction de réduction est prolongée 60 minutes à 20°. La réactivation de la GPDH native par cette méthode est de 85 à 100 %.

2) Dosage des groupements -NH₂ libres.

a/ Par la méthode de Moore et Stein (94).

Les réactifs utilisés sont la ninhydrine et l'hydrindantine qui est obtenue par réduction de la ninhydrine (95). Le réactif contient 2 mg de ninhydrine, 0,3 mg d'hydrindantine dissous dans 75 ml de méthylcellosolve et 25 ml de tampon acétate Na (pH 5,5) 4 M.

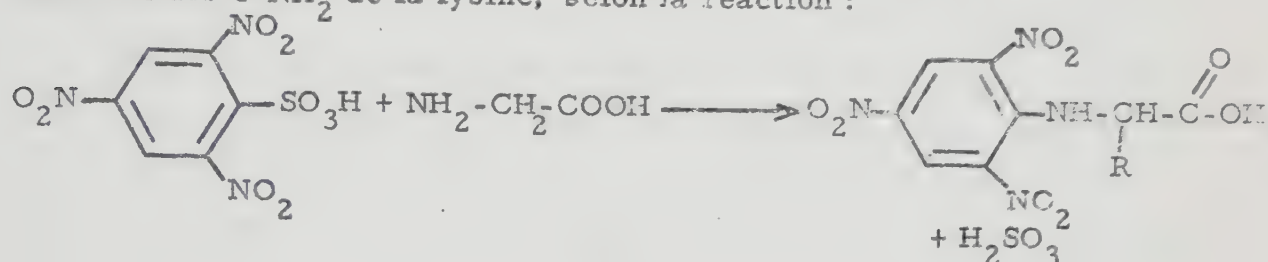
- Conditions expérimentales du dosage : 2 ml d'enzyme (≈ 50 µg) sont ajoutées à 1 ml de réactif, agités et chauffés 15 minutes dans un bain à 100°. Les

solutions colorées placées à température ordinaire sont diluées par 5 ml d'un mélange éthanol-eau (50:50).

La concentration NH_2 est déterminée par comparaison avec une courbe standard de coloration faite avec la leucine (0,05 à 0,2 mM) par mesure de la densité optique à 570 nm.

b/ Par la méthode de Habeeb (96).

Okuyama et Satake (97), puis Satake et al. (98) ont étudié la trinitrophénylation par le TNBS des $-\text{NH}_2$ d'acides aminés. Ils ont démontré que à pH 8 en milieu aqueux, ce réactif réagit préférentiellement avec les $\alpha\text{-NH}_2$ ou de façon similaire sur les $\epsilon\text{-NH}_2$ de la lysine, selon la réaction :



Le TNBS est sans action sur l'imidazole de l'histidine, sur l'arginine ni sur les hydroxyles de la tyrosine de la sérine ou de la thréonine. Il peut réagir avec les $-\text{SH}$ de la cystéine, mais Kotaki et al. (99) ont montré que la liaison $\text{S}-\text{TNB}$ était très instable à pH alcalin et qu'en présence de $-\text{NH}_2$ le TNBS s'y fixait préférentiellement. C'est donc une méthode particulièrement intéressante pour doser spécifiquement les groupements α et $\epsilon\text{-NH}_2$.

Habeeb (96) a développé cette méthode dans le but non pas de marquer spécifiquement certains $-\text{NH}_2$ particulièrement réactifs, mais tous les α et $\epsilon\text{-NH}_2$ présents dans une protéine. Lorsqu'un grand nombre de $-\text{NH}_2$ sont marqués, il a montré que le $\epsilon^{340\text{nm}}_{\text{M}}$ moyen est de 10.500.

- Conditions expérimentales : Le milieu réactionnel contient 0,6 à 1 mg/ml de protéines dissoutes dans un tampon Tris pH 8,0, et 1 ml de TNBS 0,1 %. La solution est placée à 40° pendant deux heures. Après le marquage on ajoute

1 ml SDS 10 % (pour solubiliser la protéine et empêcher sa précipitation lors de l'addition de HCl) et 0,5 ml HCl N. Le nombre de NH_2 marqués est déterminé d'après la mesure de l'absorbance à 340 nm.

c/ Dosage des $-\text{NH}_2$ terminaux.

Le dosage des $\alpha\text{-NH}_2$ terminaux a été réalisé par dansylation, selon la méthode de Hartley et Massey, modifiée par Gros et Labouesse (80).

3) Dosage des tryptophanes et des tyrosines par la méthode de Goodwin et Morton (100).

Cette méthode utilise la propriété classique des protéines en solution de donner un spectre d'absorption dans l'ultraviolet dû au tryptophane, à la tyrosine et à un degré moindre à la phénylalanine. Le pH a un effet important sur l'absorption maximum et les mesures spectrophotométriques sont faites habituellement à pH alcalin (NaOH 0,1 N). Il existe deux points d'intersection des courbes d'absorption 257 nm et 294 nm. A ces longueurs d'onde les valeurs des extinctions sont proportionnelles au contenu Tryptophane + tyrosine. On choisit en général 294 nm ce qui correspond à une valeur proche du maximum pour la tyrosine. En tenant compte des extinctions lues à 280 nm et à 294 nm, on peut déterminer la concentration de chaque acide aminé par la relation de Goodwin et Morton : $E_{280} = y\epsilon_1 + (x - y)\epsilon_2$

$$\text{soit } y = \frac{E_{280} - x\epsilon_2}{\epsilon_1 - \epsilon_2}$$

x = nombre total de mole/l ; y = Moles Tyr/l ; $(x - y)$ = Try Moles/l.

ϵ_1 = Extinction molaire de la tyrosine à 294 nm en NaOH 0,1 N

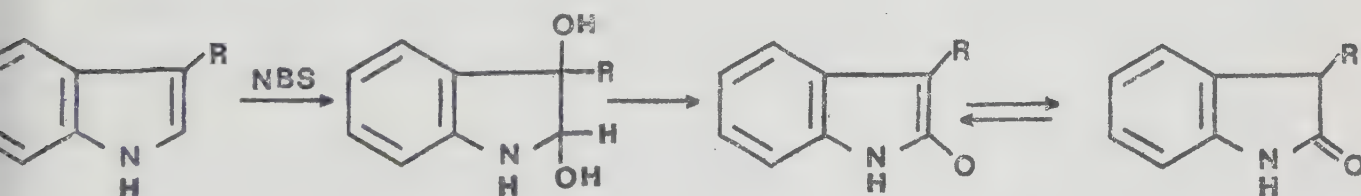
ϵ_2 = Extinction molaire du tryptophane à 280 nm en NaOH 0,1 N.

- Conditions expérimentales : L'enzyme (0,300 à 0,600 mg/ml) est placée dans un milieu NaOH 0,1 N final ; la densité optique est lue à 294 et 280 nm avec un spectrophotomètre Jobin et Yvon dans des cuves de 0,5 ml. La valeur lue est corrigée pour la diffusion, déterminée par des lectures entre 340 nm et 370 nm.

4) Marquage du tryptophane par le N-bromosuccinimide.

L'action du N-bromosuccinimide sur les dérivés indoles (101) ou sur des protéines contenant des tryptophanes permet de doser spectrophotométriquement les résidus indoles. Le marquage en effet entraîne la formation d'un oxindole, qui absorbe fortement à 261 nm ($\epsilon_M = 10.300$) alors que la bande à 280 nm diminue.

La réaction se fait par l'intermédiaire du dihydroindole, composé labile qui donne l'oxindole (102).



L'oxydation menée en milieu acide (pH 4 à 5,5) est très spécifique des tryptophanes (103). Cependant dans certaines conditions d'autres résidus amino-acides peuvent être touchés (tyrosine, histidine, cystéine); seule la tyrosine peut être gênante pour le dosage spectrophotométrique.

Le nombre de tryptophanes est donné par la relation de Spande et Witkop (104).

$$\frac{\mu\text{Moles Try}}{\mu\text{Moles protéine}} = n = \frac{\Delta\text{OD} \times 1,31 \times \text{PM}}{C \times 5.500}$$

- ΔOD = variation de l'absorbance à 280 nm entre le début et la fin de l'expérience, corrigée pour la diminution d'absorbance due à la dilution.

- 1,31 est le facteur de correction tenant compte de l'absorbance de l'oxindole à 280 nm. Le produit $\text{OD} \times 1,31$ donne la contribution de l'absorbance due au tryptophane.

- PM = poids moléculaire

- C = concentration en protéines

- 5.500 = ϵ_M du tryptophane

- Conditions expérimentales : L'enzyme (600 $\mu\text{g/ml}$) se trouve dans un tampon acétate 0,04 M (pH 5,2). Le volume final est de 0,5 ml. On ajoute le N. B. S. (2 mg/ml) de 5 en 5 μl jusqu'à ce qu'une addition de réactif ne provoque plus de diminution d'absorbance. On détermine alors la variation de l'absorbance entre le début et la fin de la réaction (ΔOD).

IV - METHODES PHYSICO-CHIMIQUES.

1) Ultracentrifugation.

a/ Vitesse de sédimentation.

Au cours des mesures de vitesse de sédimentation, l'ultracentrifugation a lieu à environ 60.000 rotations/mn. Nous avons observé la sédimentation de la protéine par deux méthodes : soit avec l'optique Schlieren, soit par absorption.

A partir du déplacement de la protéine, on définit la constante de sédimentation apparente par la relation $(S_c)_{\text{app}} = \frac{dr/dt}{2r}$

Si r_0 et r_b sont les positions des limites solvant-protéine au temps 0 mn et au temps t, on a la relation :

$$\text{Log } r_b = \text{Log } r_o + \frac{S \omega^2 t}{2.303}$$

La représentation $\text{Ln } r_b$ en fonction du temps, donne une droite de pente $S \omega^2$. A partir de la constante de sédimentation ainsi calculée, la relation de Svedberg et Pedersen (105) permet de déterminer S_{20}^W , c'est à dire la valeur obtenue pour la constante lors d'une expérience faite à 20° dans l'eau.

Les expériences ont eu lieu en présence de 4 à 5 mg d'enzyme/ml dans des cellules de 10 mm de parcours optique, à 67.770 rotations par minute, ou de 0,500 à 0,800 mg/ml dans des cellules de 39 mm de parcours optique dans un rotor type AME à 50.740 rotations par minute, dans une ultracentrifugeuse Spinco Modèle E.

b/ Sédimentation dans un gradient de saccharose.

Un gradient de saccharose continu entre 5 et 20 % est préparé ; puis 0,1 ml (2 mg d'enzyme) sont déposés sur le ménisque. L'ultracentrifugation est alors réalisée à 5° dans une ultracentrifugeuse Spinco L2 65 B dans un rotor SW 39, à 39.000 rotations par minutes pendant 13 heures.

A la fin de la centrifugation, le fond du tube est percé par une aiguille, et au moyen d'une pression assurée avec un piston, dont le déplacement est contrôlé par un vernier ; on recueille goutte à goutte le milieu de sédimentation (10 gouttes par tube). La lecture des fractions en densité optique à 280 nm permet de tracer le profil du gradient.

2) Fluorimétrie.

Les mesures ont été faites avec un spectrofluorimètre Aminco Bowman (Modèle 1620-847) en présence de 30 à 50 µg d'enzyme par ml dans 2 ml de tampon [TEA-EDTA], à 20°.

3) Dispersion rotatoire optique.

Le spectre de dispersion rotatoire optique de la GPDH comporte deux zones intéressantes ; (a) entre 270 et 300 nm, un effet Cotton extrinsèque se produit lorsque le coenzyme interagit avec l'apoenzyme (27, 105) ce qui indique un changement de l'environnement des tryptophanes ; (b) à environ 233 nm un effet Cotton intrinsèque peut permettre d'estimer le contenu en α helice (107).

Yang et Moffit (108) ont exprimé une relation entre le pouvoir rotatoire spécifique et la longueur d'onde (relation 1).

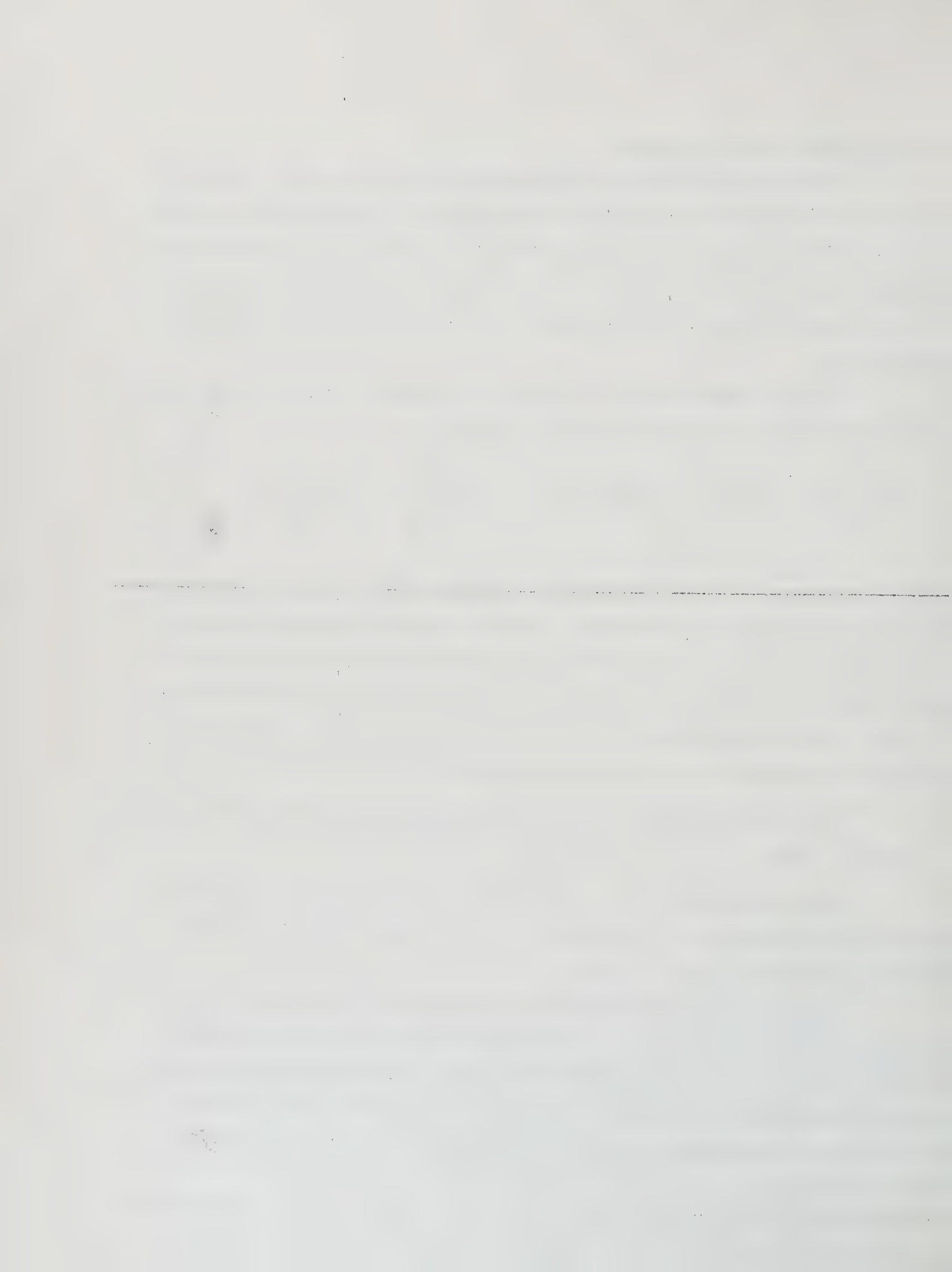
$$(1) \quad [M'] = \frac{3}{n^2 + 2} \times \frac{MRW}{100} [\alpha] = \frac{a_o \lambda_o^2}{\lambda^2 - \lambda_o^2} + \frac{b_o \lambda_o^4}{(\lambda^2 - \lambda_o^2)^2}$$

$[M']$ représente le pouvoir rotatoire spécifique par résidu acide aminé ,
 $[\alpha]$ le pouvoir rotatoire spécifique , MRW le poids moléculaire moyen d'un résidu (109 dans le cas de la GPDH (109)). n est l'indice de refraction de l'eau à différentes longueur d'onde (110). λ est la longueur d'onde de mesure, b_o et λ_o sont des constantes caractéristiques de l' α -helice, et le terme a_o dépend de l' α -helice et de la contribution des résidus acides aminés.

La représentation de la dispersion rotatoire peut être faite selon la relation 2 $[M'] (\lambda^2 - \lambda_o^2)$ en fonction de $1/(\lambda^2 - \lambda_o^2)$.

Pour déterminer λ_o , on fait varier ce terme jusqu'à obtenir la linéarité de la réaction 2. On obtient $\lambda_o = 212 \pm 5$ nm) ; dans le cas de la GPDH λ_o est de 212 nm (27, 111).

Les mesures de dispersion rotatoire ont été faites avec un spectropolarimètre "Fica". Avant les mesures, les solutions enzymatiques sont placées dans des cuves thermostatées Cary de 1 ou 2 cm de parcours optique selon les expériences et équilibrées pendant 20 mn à 10°. Les concentrations d'enzyme sont comprises entre 100 et 300 μ g/ml, le spectre est fait entre 450 et 220 nm.



CHAPITRE II : RESULTATS

RESULTATS

Dans la première partie de ce travail, sont analysées les propriétés fondamentales de l'hydrolyse chymotrypsique de la GPDH, et les conditions les plus favorables à l'obtention de la fraction oxydante. La seconde partie sera consacrée à l'étude des propriétés de la fraction oxydante.

I - MISE AU POINT DES CONDITIONS DE LA PROTEOLYSE.

A - Mesure de la vitesse de protéolyse.

La mesure de la vitesse de protéolyse est suivie par la diminution de l'activité arsenylante en fonction du temps de protéolyse chymotrypsique car sa variation dépend directement du nombre de liaisons peptidiques coupées.

B - Concentration en chymotrypsine.

La protéolyse a lieu à 30° pendant 30 minutes dans un tampon triéthanolamine 0,05 M EDTA 0,001 M (pH 7,9) ou [tampon TEA-EDTA], en présence de GPDH $1,04 \cdot 10^{-3}$ M. La concentration en chymotrypsine est variable. Le volume final est de 1 ml. Après 30 minutes d'incubation, on arrête la réaction par le DFP (20 μ l 0,014 M) et l'enzyme est stabilisé par du NAD^+ 0,8 mM final. L'incubation est placée à 0°. La disparition de l'activité protéolytique a été contrôlée par le test d'hydrolyse de l'ATEE, selon Schwert et Takenaka (112). La mesure de l'activité arsenylante (fig. 2) en fonction de la concentration en chymotrypsine, nous a amené à utiliser de 20 à 40 μ g d'enzyme protéolytique par mg de GPDH. Ainsi en 30 mn l'activité

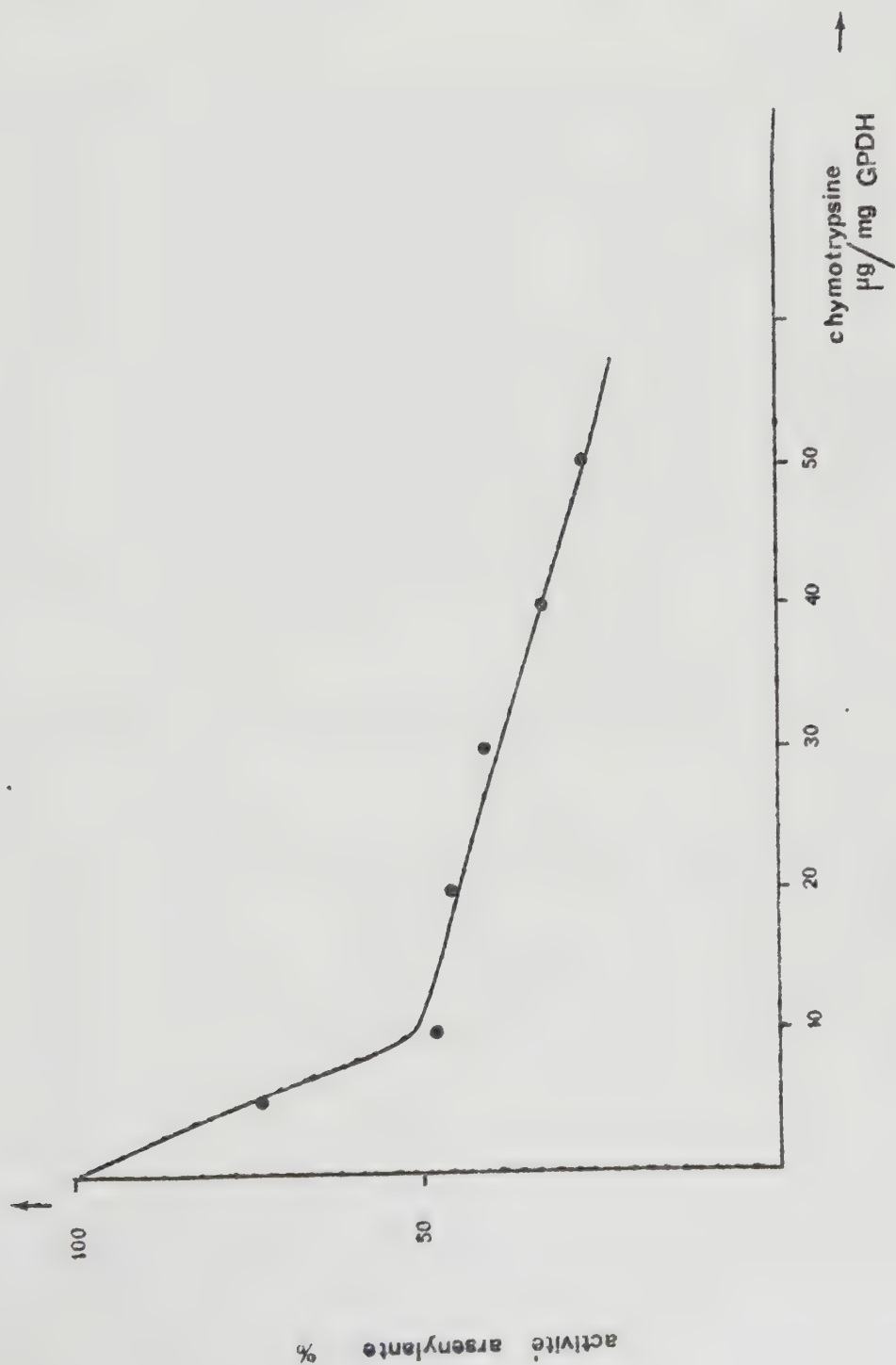


Figure 2 : Variation de l'activité arsénylante de la GPDH en fonction de la concentration en chymotrypsine.

s'abaisse de 70 %. Polgär (78), Yang et Deal (42) et très récemment Fenselau (113) ont utilisé pour la protéolyse de la GPDH des concentrations comparables. Toutefois, Krinsky et Racker utilisaient une concentration en protéase dix fois moindre et observaient en 25 minutes une baisse de l'activité égale à 90 % (12).

C - Stabilité de l'activité oxydante de l'enzyme protéolysé.

La GPDH est très stable lorsque le pH est compris entre 7,5 et 9 ; la protéolyse, menée à 30° ne peut se faire qu'à l'intérieur de ces limites, sinon l'apoenzyme précipite rapidement au cours de la protéolyse. Entre pH 5 et 7,5, la stabilité de l'enzyme protéolysé est très faible. L'action de la chymotrypsine a été stoppée alors que l'activité arsenylante résiduelle était égale à 21,6 %, puis des parties aliquotes ont été prélevées et placées à différents pH (compris entre 5 et 9) à 22°. Deux tampons permettent de conserver une activité arsénolytique importante : les tampons tris et triéthanolamine entre pH 8 et 9 (tableau VI).

Tableau VI : Stabilité de l'activité oxydante dans le protéolysat en fonction du pH et du tampon.

Temps après protéolyse	[TEA-EDTA] pH 8,0	[TRIS-EDTA] pH 8,5	[TEA-EDTA] pH 8,5	[TRIS-EDTA] pH 9
	Activité oxydante %			
0	100	100	100	100
3 h 30	88	77	88	74
18 h	74	56	74	56

Le tampon triéthanolamine 0,05 M, pH 8,0 confère un maximum de stabilité au protéolysat. Krinsky et Racker (12) avaient choisi pour tampon la triéthanolamine 0,05 M (pH 7, 9); dans la plus grande partie de notre travail, nous avons conservé ces conditions expérimentales. Lorsque l'emploi de la triéthanolamine était rendu impossible (dosage des $-NH_2$), nous avons utilisé le tampon Tris 0,05 M, au même pH que précédemment.

Le tableau VII met en évidence la stabilité du protéolysat après 3 heures à 22° ; NaCl, KCl, LiCl 0,1 M permettent dans ce temps de conserver 90 % de l'activité initiale. Au contraire $(NH_4)_2SO_4$ 0,1 M est inhibiteur et diminue la stabilité de l'enzyme. Ce résultat nous a amené à utiliser au cours de la purification du protéolysat brut sur gel de Séphadex G 100, un milieu d'élution contenant NaCl 0,1 M.

Tableau VII : Stabilité de l'activité oxydante dans le protéolysat en fonction de la nature des sels.

Temps	Activité oxydante %				
	Témoin (en absence de sels)	NaCl 0,1M	KCl 0,1 M	LiCl 0,1M	$(NH_4)_2SO_4$ 0,1 M
0 mn	100	100	85	82	64
180 mn	86,5	90	85	82	46

II - PROTEOLYSE DE LA GPDH, PROPRIETES, OBTENTION DE LA FRACTION OXYDANTE.

A - Protéolyse de l'apoenzyme.

1) Variation des activités en fonction du temps.

La figure 3 montre la variation des activités arsenylante, oxydante, phosphorylante et estérasique en fonction du temps de protéolyse.

a/ Activité arsenylante.

La vitesse d'oxydation du D-glycéraldéhyde-3-phosphate en présence d'arséniate comme accepteur d'acyle, par la GPDH, diminue rapidement au cours de la protéolyse jusqu'à une valeur égale à 35 % de l'activité initiale (fig. 3). D'après l'expression $\text{Log } A_0/A_t$ en fonction du temps où A_0 est l'activité initiale et A_t l'activité résiduelle au temps t de la protéolyse on détermine les constantes de vitesse de la disparition de l'activité en fonction du temps. On observe deux vitesses de disparition de l'activité : $k_1 = 0,048 \text{ min}^{-1}$: cette première vitesse se manifeste entre 100 et 35 % , au-dessous de 35 % d'activité résiduelle $k_2 = 0,0087 \text{ min}^{-1}$. La vitesse initiale est évaluée en reportant la différence entre la pente au début de la réaction et la pente finale (k_2 petit devant k_1).

b/ Activités oxydante et phosphorylante.

L'oxydation du D-glycéraldéhyde en présence d' α -monothioglycérol permet de démontrer l'existence d'une réaction d'oxydoréduction au cours de laquelle le site de phosphorylation n'est pas utilisé. La figure 3 met en évidence la stabilité de cette fonction de transacylation jusqu'à 35 % d'activité arsenylante résiduelle, puis celle-ci baisse à son tour : $k_1 = 0,0023 \text{ min}^{-1}$, $k_2 = 0,007 \text{ min}^{-1}$.

Lorsque P_i est présent dans le milieu réactionnel il y a compétition entre les deux accepteurs d'acyle, thioglycérol et phosphate ; l'activité phosphorylante doit donc être représentée comme la différence entre l'activité enzymatique en présence et en absence de phosphate. Ainsi, la figure 3 montre que la cinétique de disparition de l'activité phosphorylante est la même que celle de l'activité arsenylante.

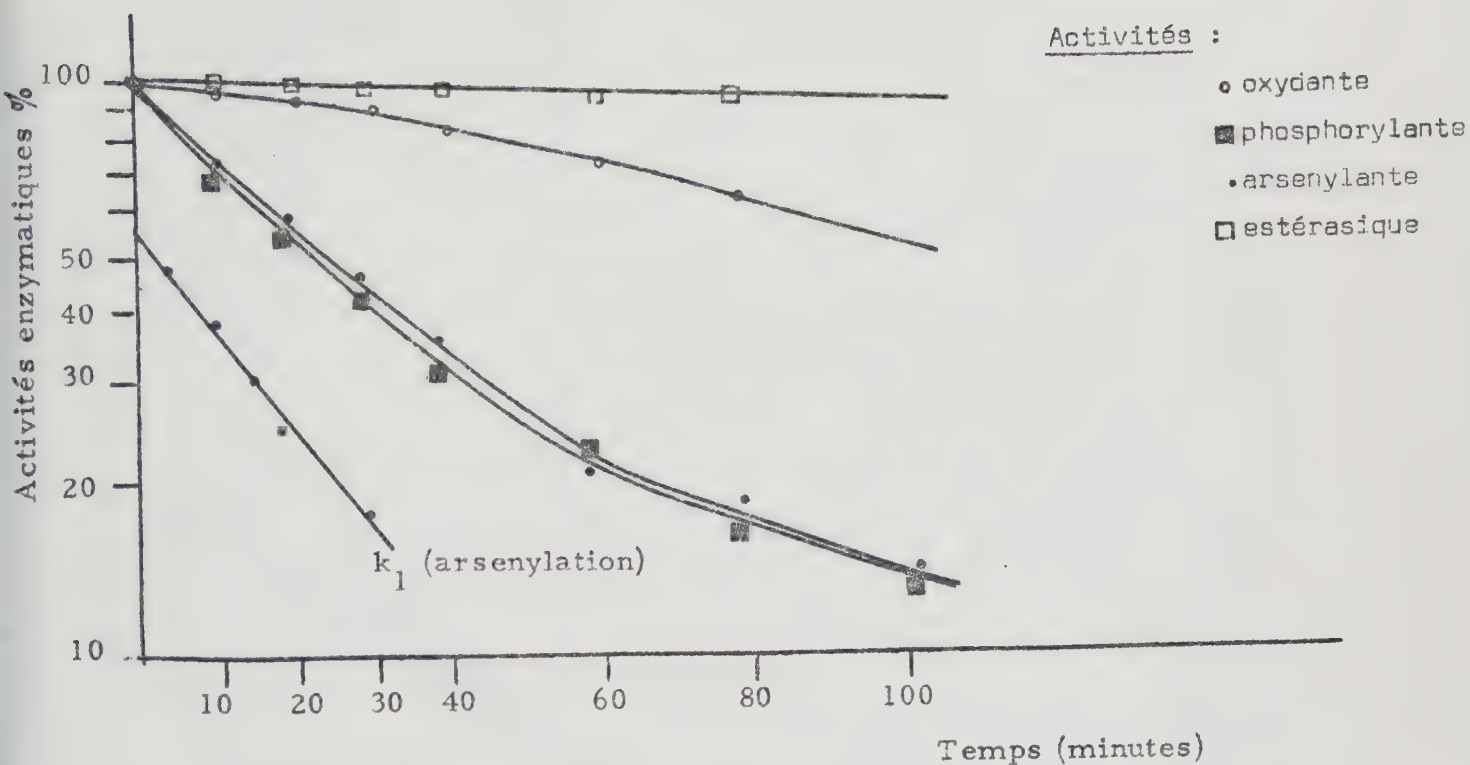


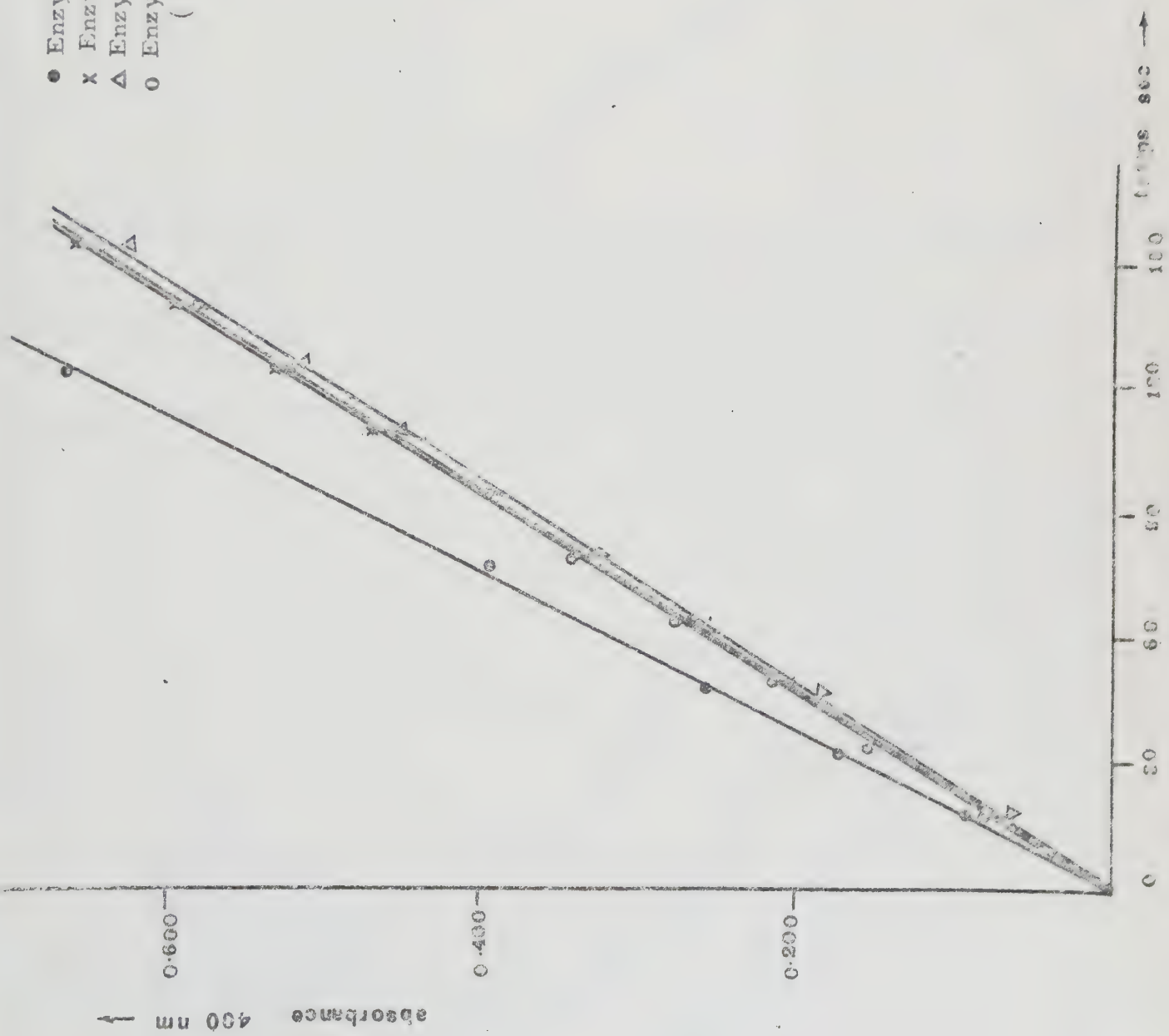
Figure 3 : Variation des activités oxydante, phosphorylante, arsenylante et estérasique en fonction du temps de protéolyse.

La protéolyse est faite sur 1,5 ml GPDH $0,76 \cdot 10^{-3}$ M, en présence de chymotrypsine $0,17 \cdot 10^{-3}$ M; de 5 en 5 minutes des parties aliquotes de 0,1 ml sont prélevées, mises à 0° dans 2 ml de tampon [TEA-EDTA], en présence de 20 μ l DFP $0,014$ M et 100 μ l NAD^+ $1,39 \cdot 10^{-3}$ M.

Les tests sont faits selon la description donnée dans les méthodes.

La vitesse initiale est évaluée en reportant la différence entre la pente au début de la réaction et la pente finale.

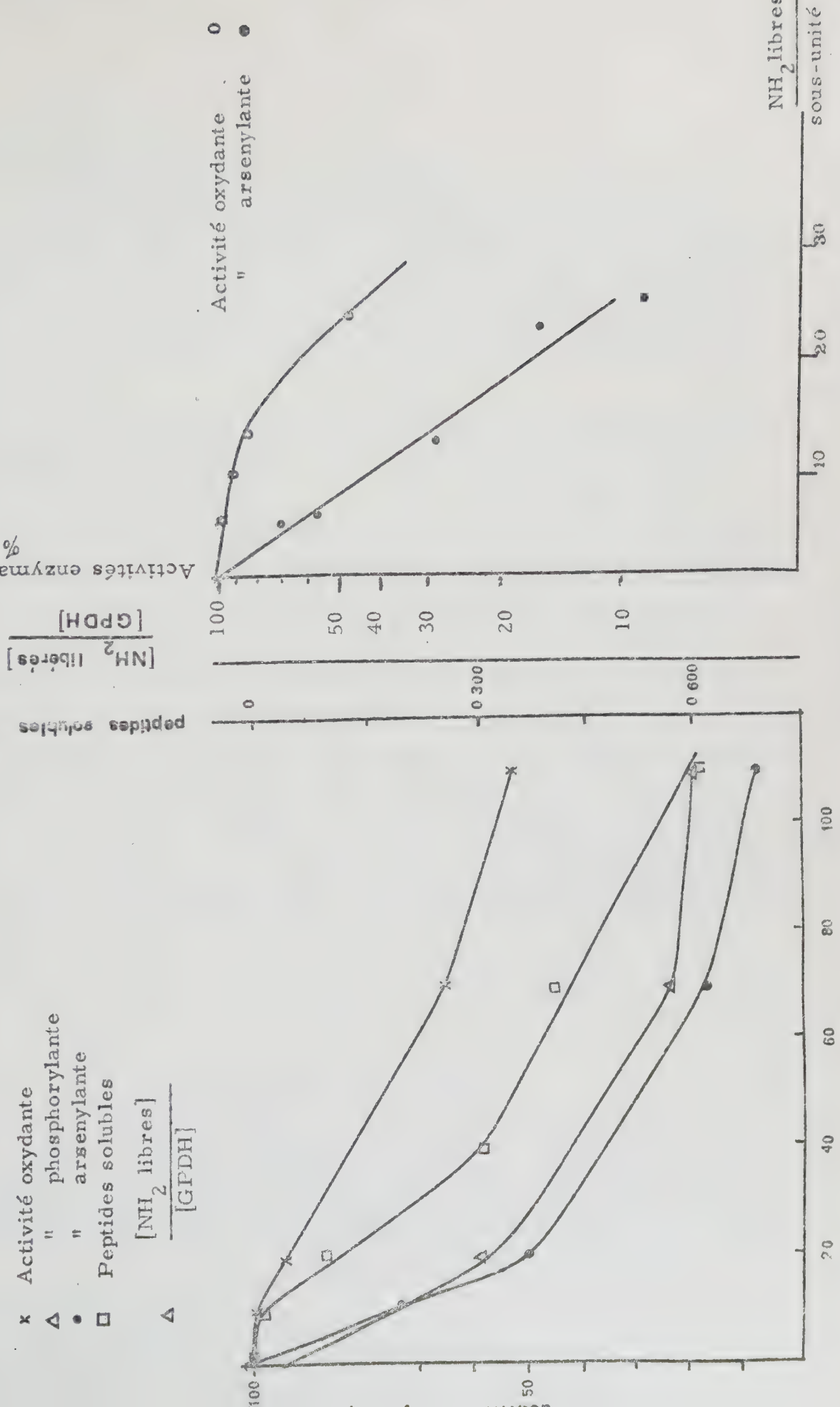
Figure 4 : Activité estérasique de la GPDH avant et après protéolyse.



- Enzyme natif
- x Enzyme natif + DFP
- Δ Enzyme natif + DFP + chymotrypsine
- Enzyme protéolysé
(% activité arsenylante 38 %)

Figure 5 : Dosage des -NH₂ libérés et des peptides solubles dans HClO₄

au cours de la protéolyse. Les conditions expérimentales sont celles de la figure 3.



c/ Activité estérasique.

La vitesse d'hydrolyse du p-NPA reste sensiblement à sa valeur initiale au cours de la protéolyse (figure 3). Le DFP stoppe l'action de la chymotrypsine et ne participe pas à la réaction estérasique observée ; nous avons également contrôlé que l'inhibition partielle de l'activité estérasique de la GPDH par le DFP observée par Park et al. (52) est négligeable dans nos conditions expérimentales (figure 4).

2) Variation des activités en fonction des liaisons peptidiques rompues et des peptides solubles dans HClO_4 3 %.

Le dosage des liaisons peptidiques rompues au cours de la protéolyse, selon la méthode de Moore et Stein (94), montre l'identité des cinétiques de disparition de l'activité arsenylante et du nombre de $-\text{NH}_2$ libérés en fonction du temps. La variation des activités arsenylante et phosphorylante en fonction du nombre de liaisons peptidiques coupées au cours de l'incubation suit une cinétique de pseudo 1er ordre (figure 5).

La précipitation de la GPDH dans HClO_4 3 % à différents temps de protéolyse permet d'observer la formation de peptides solubles de poids moléculaire en général inférieur à 5.000 ; leur concentration dans le surnageant est mesurée par la densité optique à 280 nm. Ces peptides n'apparaissent que lorsque l'activité arsenylante résiduelle est inférieure à 50 % (activité oxydante : 90 %).

C'est à ce niveau de la protéolyse que l'activité oxydante commence à s'abaisser (fig. 5).

3) Dosage des groupements sulfhydriles par le DTNB.

L'intérêt essentiel du dosage des groupements sulfhydriles au cours de la protéolyse tient au fait que l'on observe par cette méthode une réaction biphasique sur l'enzyme natif. 3,5 à 4,5 groupements sulfhydriles sont dosés

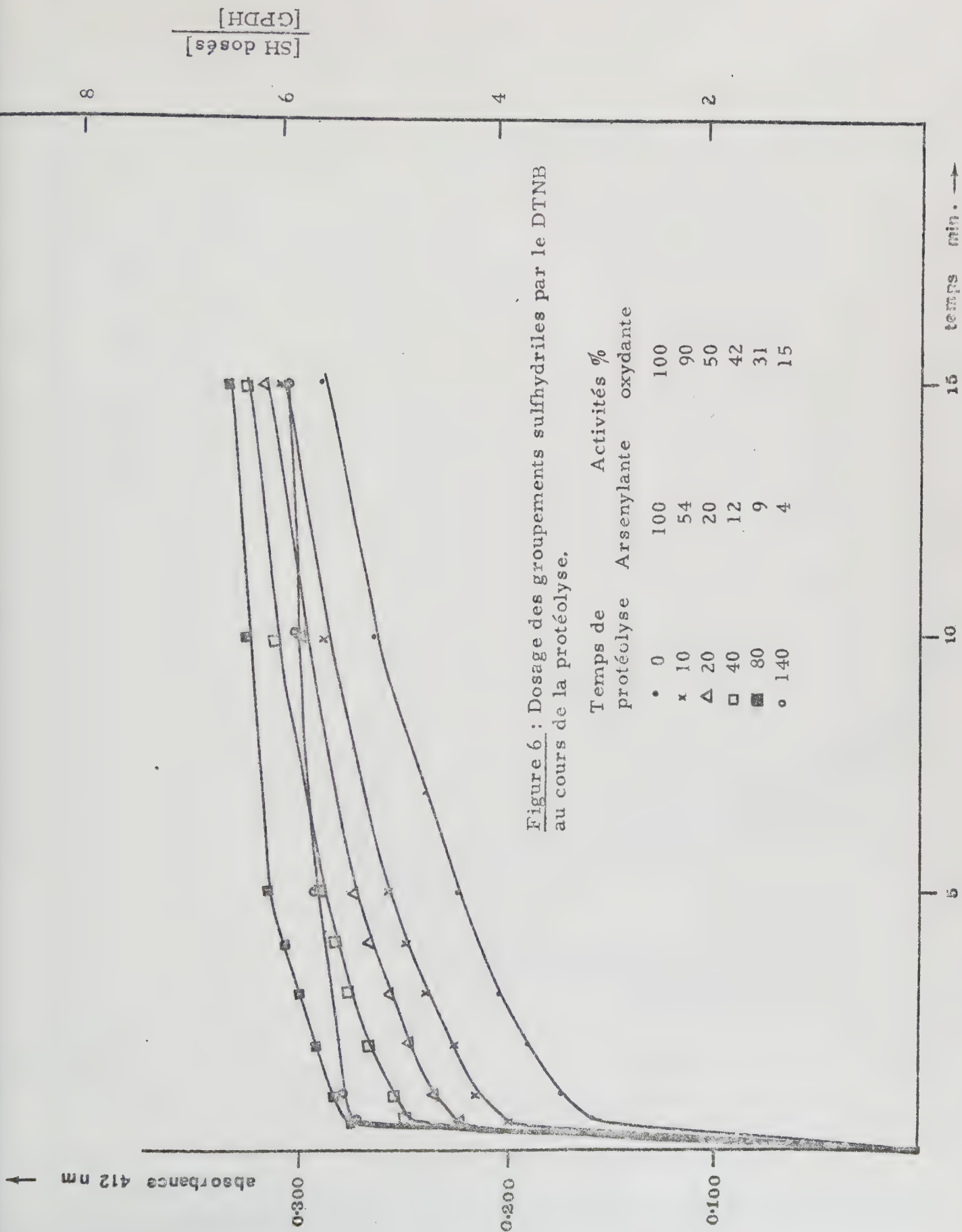
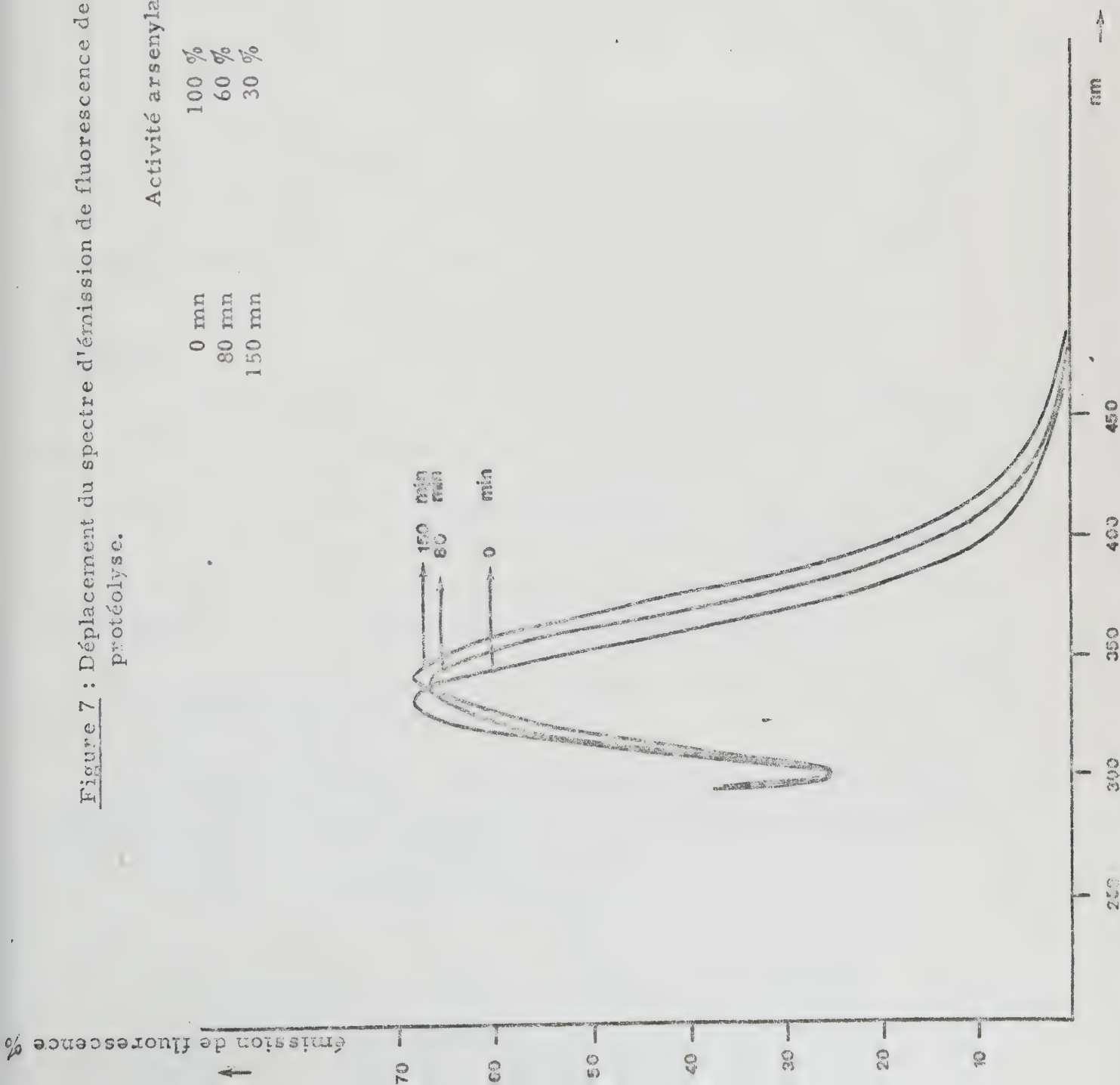


Figure 7 : Déplacement du spectre d'émission de fluorescence de la GPDH au cours de la
protéolyse.

Activité arsenylante %

0 mn
80 mn
150 mn



rapidement, tandis que les autres sont beaucoup moins accessibles au DTNB ; en effet les trois suivants sont dosés entre 3 et 15 mn. Au cours de la protéolyse, les groupements sulfhydriles sont démasqués et dosés de plus en plus rapidement (fig. 6). Entre 100 et 60 % d'activité arsenylante on en dose 5, 5 et 6, 5. En fin de protéolyse, il y a une diminution des groupements sulfhydriles dosés ce qui doit correspondre à une oxydation, favorisée au cours de la protéolyse à 30°.

4) Variation de l'émission de fluorescence au cours de la protéolyse.

La protéolyse de l'apoenzyme entraîne un déplacement de la bande d'émission de fluorescence dont le maximum passe de 335 à 350 nm ; ce déplacement manifeste l'exposition progressive des tryptophanes au solvant (fig. 7).

Conclusion.

Ces études cinétiques mettent en évidence la présence de trois groupes de fonctions catalytiques selon leur stabilité (114, 115).

a/ Les activités phosphorylante et arsenylante sont très sensibles à l'action de la chymotrypsine ; chaque coupure de liaison peptidique entraîne au cours de la protéolyse la même perte d'activité ; ces fonctions sont sans doute très sensibles aux changements de structure de la protéine.

b/ L'activité oxydante commence à diminuer lorsque se produit l'apparition de peptides solubles dans HClO_4 .

c/ L'activité estérasique, enfin, persiste malgré une protéolyse très prolongée, et la disparition de toutes les autres activités ; elle semble exiger une structure moins organisée.

B - Effet des ligands et de l'acide o-iodosobenzoïque sur la protéolyse et les propriétés physico-chimiques de la GPDH.

L'action de la chymotrypsine sur l'apoenzyme permet d'isoler une fraction oxydante (voir figure 19) ; cependant le rendement en cette fraction est faible. Il est nécessaire de rechercher les conditions expérimentales susceptibles de l'augmenter sensiblement.

Dans ce but, nous avons étudié l'influence, sur la protéolyse et sur les propriétés physico-chimiques de la GPDH, de divers ligands (nucléotides, substrats) capables éventuellement de protéger une partie du centre actif de l'enzyme.

1) Effet des ligands sur la protéolyse.

a/ Effet des substrats.

- Le D-glycéraldéhyde-3-phosphate diminue la vitesse de protéolyse de l'enzyme ; cet effet protecteur est total lorsque l'enzyme est mis en présence de 120 équivalents de substrat par mole (figure 8) . Au contraire même à fortes concentrations (10^3 moles par mole d'enzyme), le D-glycéraldéhyde ne modifie pas le comportement de la GPDH vis à vis de la chymotrypsine.

b/ Effet des nucléotides.

- NAD⁺, NMN, NADH : La présence de deux moles de NAD⁺ par mole d'enzyme protège les activités catalytiques et la structure de l'apoenzyme lors de l'hydrolyse chymotrypsique (fig. 9). Après une protéolyse de 140 mn, on dose comme dans l'enzyme natif quatre valines N-terminales ; il n'y a pas eu de coupure de liaison peptidique. Le NADH ou le NMN au contraire n'empêchent pas l'action de la chymotrypsine (fig. 9). Lorsque le NAD⁺ est ajouté à l'enzyme traité par l'acide iodosobenzoïque avant la protéolyse (figure 10), il ne protège plus la GPDH. Si l'oxydation a lieu sur l'holoenzyme, on n'observe pas

Figure 8 : Effet des substrats de la GPDH sur la protéolyse de l'apoenzyme.

Les milieux d'incubation contiennent 88,0 mμMoles d'enzyme dissoutes dans un tampon [TEA-EDTA], pH 7,9 ; 0,9 mμMoles de chymotrypsine sont ajoutées au temps 0 minute. Les protéolyses ont été réalisées en présence de substrats (D-glycéraldéhyde et glycéraldéhyde-3-phosphate) pendant 140 mn à 30°. L'incubation est stoppée par 50 μl de DFP 0,014 M ; l'enzyme stabilisé par NAD^+ 0,8 mM est placé à 0°. Les prélèvements et les tests sont réalisés selon le processus décrit précédemment.

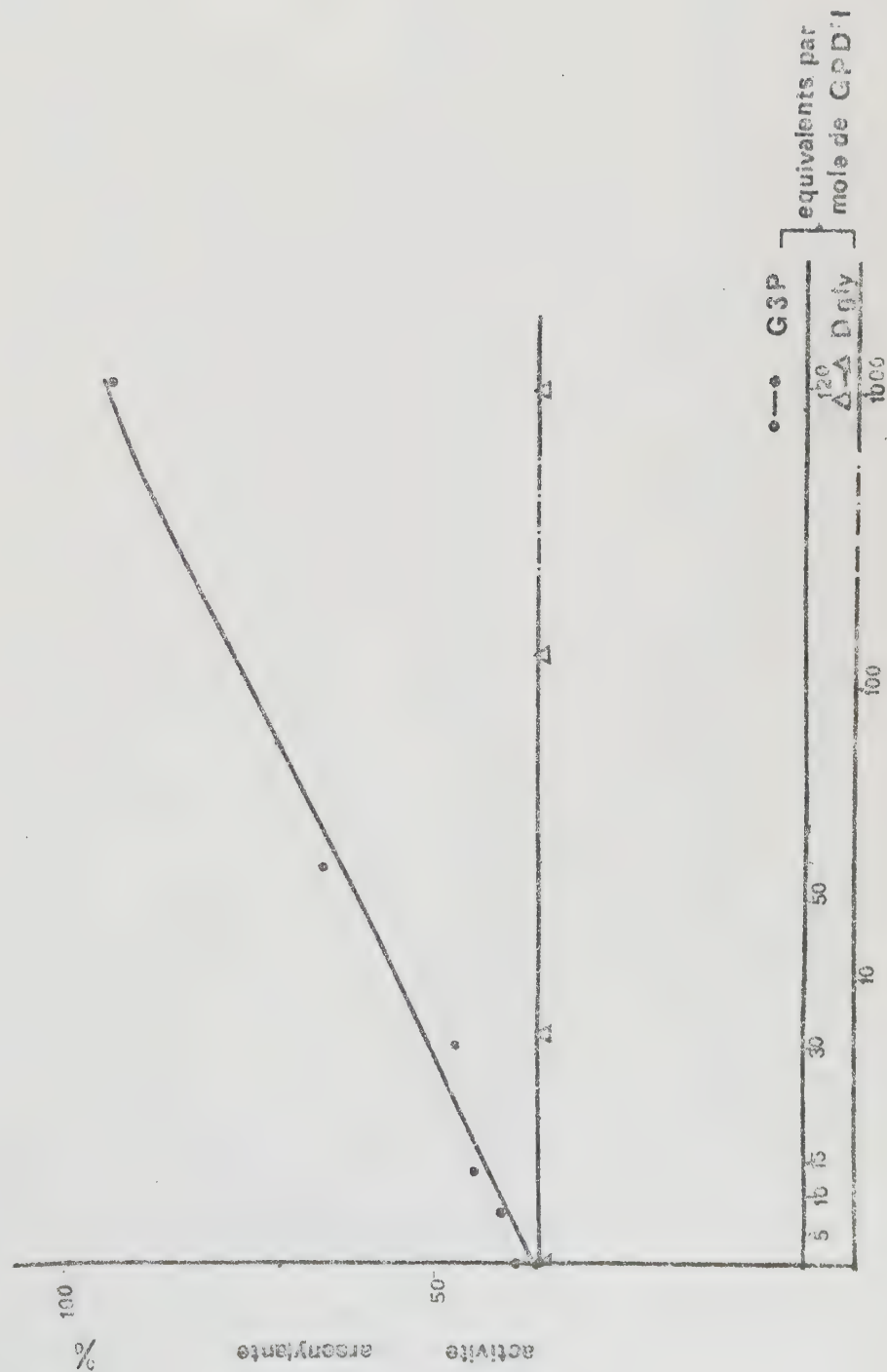
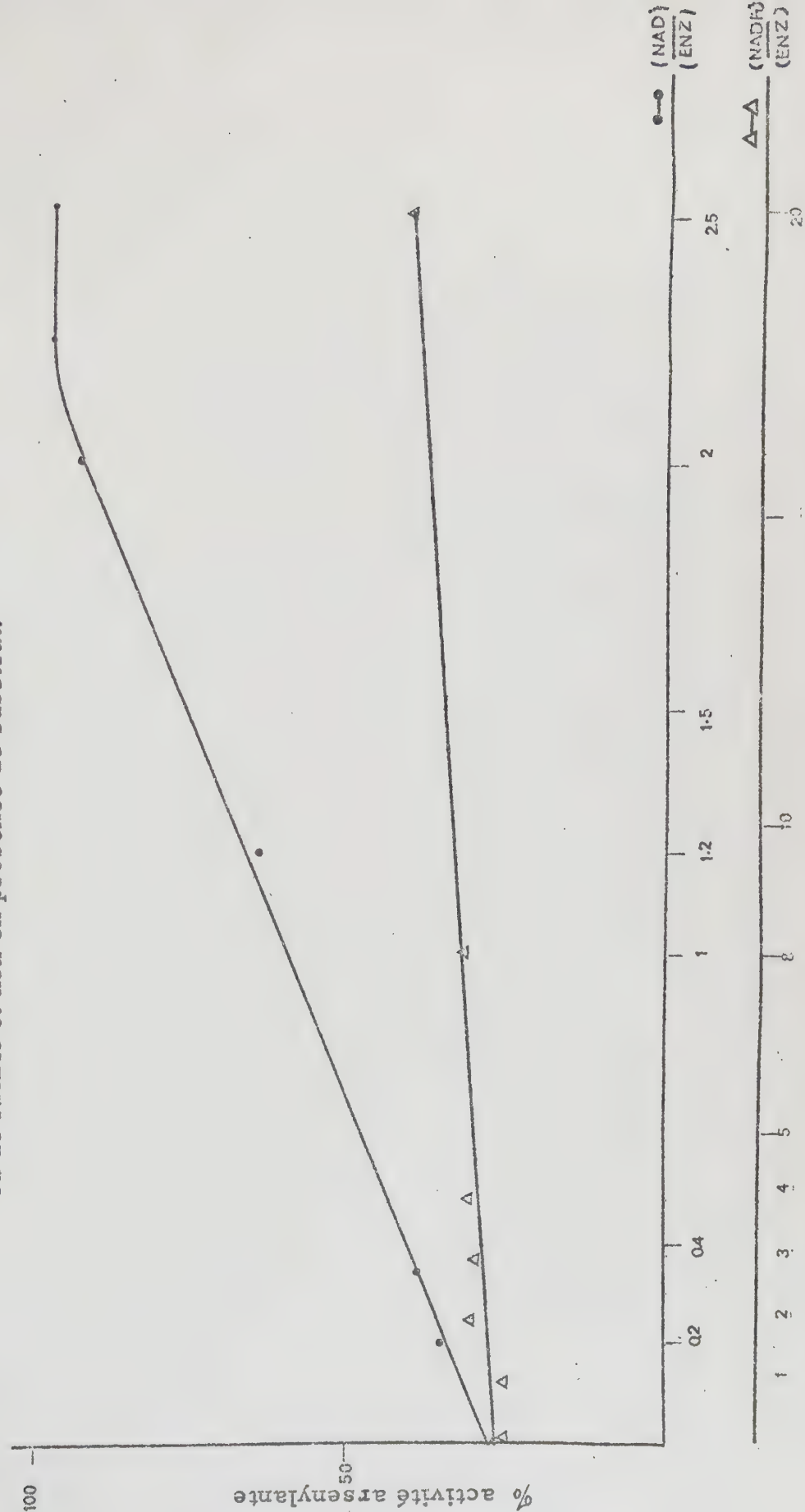


Figure 9: Effet du NAD^+ et du NADH sur la protéolyse de l'apoenzyme.

Les conditions expérimentales ont été décrites dans la figure 8. + à une exception près ; la protéolyse a lieu en présence de NAD⁺ ou de NADH et non en présence de substrat.



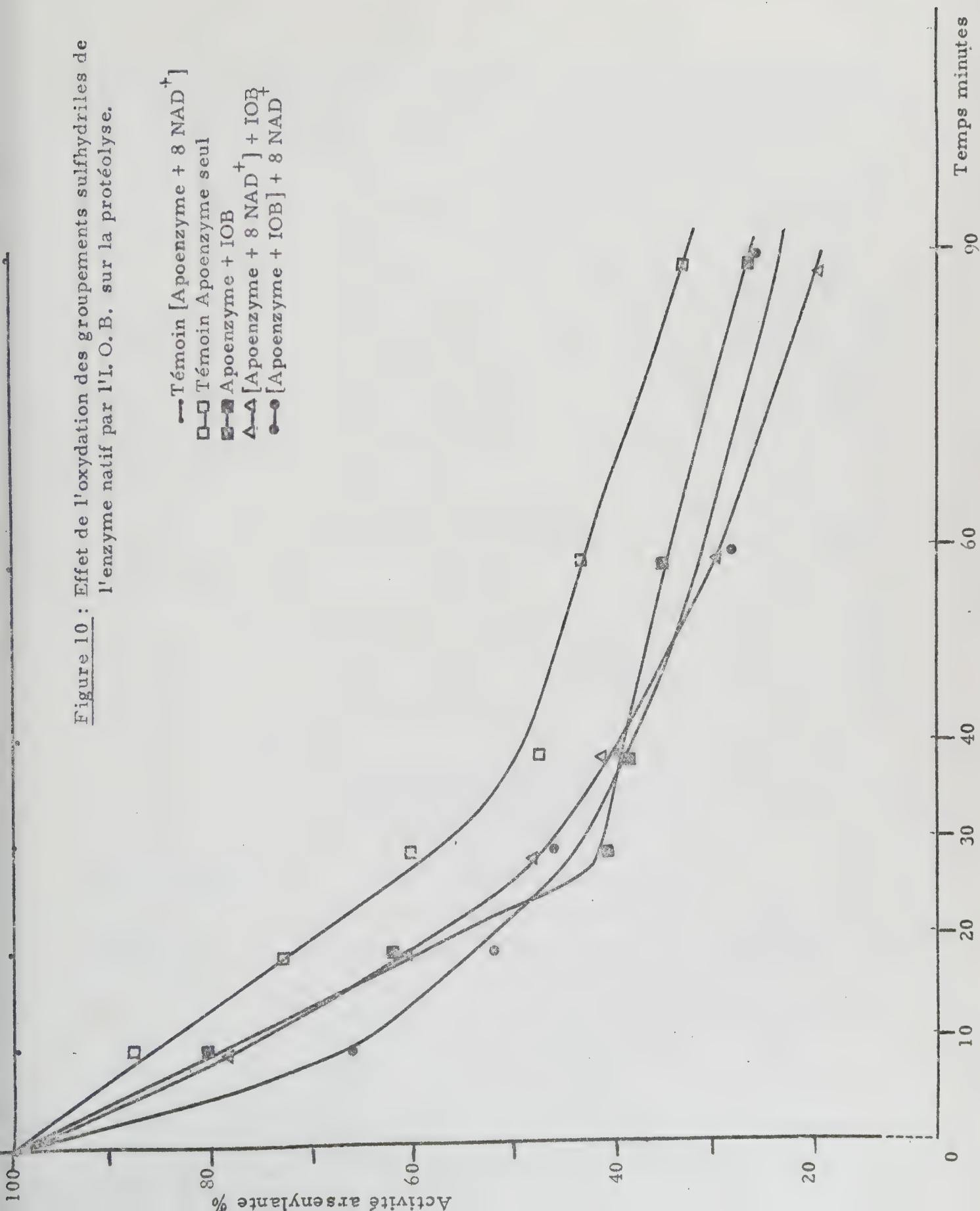
Légende de la Figure 10.

La protéolyse a lieu dans les conditions décrites précédemment ; la concentration en GPDH est de 7,6 mg/ml. L'acide o-iodosobenzoïque est dissous à pH 7,9 dans un tampon [TEA-EDTA] à une concentration de 0,038 mM. Les groupements -SH de l'enzyme sont oxydés en présence de 5 équivalents d'acide o-iodosobenzoïque par mole d'enzyme, à 20°, pendant 60 minutes. Avant de protéolyser l'enzyme, on contrôle la disparition de l'activité arsénylante et la réversibilité de la réaction obtenue à la suite d'addition de 2-mercaptoéthanol 0,1 M, en 30 minutes, à 20°.

Après chaque prélèvement au cours de la protéolyse réalisé selon le processus décrit dans les méthodes et réactivation, on contrôle l'activité arsénylante.

Deux séries de protéolyse sont faites dont les témoins sont l'apo-enzyme, apoenzyme + 8 équivalents NAD^+ .

Figure 10 : Effet de l'oxydation des groupements sulfhydriles de l'enzyme natif par l'I. O. B. sur la protéolyse.



de protection : l'ordre d'addition du NAD^+ et de l'acide iodosobenzoïque n'a pas d'influence sur la protéolyse ; dans les deux cas, le NAD^+ n'assure plus la conformation de l'holoenzyme.

- AMP : la présence d'AMP-5' ainsi que Polgär l'a mis en évidence sensibilise la GPDH à l'égard des enzymes protéolytiques (78).

La figure 11 A représente la sensibilisation de l'apoenzyme en fonction de la concentration en AMP. Cet effet n'est pas provoqué par la dissociation de l'enzyme ; les constantes de sédimentation pour l'apoenzyme et le complexe apoenzyme-AMP sont de 6,75 et 6,85 respectivement. Cette dissociation n'intervient que si le nucléotide adénylique est en très fortes concentrations (10 mM) (43, 41).

La protection apportée à la GPDH par 2 équivalents de NAD^+ au cours de la protéolyse chymotrypsique est levée par la présence d'AMP (figure 11 B).

Alors que l'activité arsenylante disparaît rapidement, l'activité oxydante persiste (tableau VIII). L'activité oxydante est de 70 % pour une activité arsenylante résiduelle de 29 %. Si la protéolyse est poursuivie plus longuement, seule l'activité estérasique demeure.

L'AMP accélère la vitesse de protéolyse sans en changer les propriétés : le rapport $\frac{\text{activité oxydante résiduelle}}{\text{activité arsenylante résiduelle}}$ ne varie pas lorsque l'AMP est ajouté au milieu de protéolyse.

Tableau VIII Effet de l'AMP sur la protéolyse de la GPDH.

Temps de protéolyse	Activité arsenylante	Activité oxydante	Activité estérasique
0	100	100	100
5	72	100	100
10	55	100	100
30	29	70	100
75	8	50	90
180	0	19	85

La diminution de l'activité arsenyante en fonction de l'apparition d' α -NH₂ par sous-unité au cours du traitement avec la chymotrypsine suit une cinétique de pseudo premier ordre. Alors que 5 liaisons peptidiques ont été rompues, l'activité oxydante reste à sa valeur initiale, puis elle décroît selon une cinétique de pseudo premier ordre (figure 12). La présence d'AMP augmente donc la vitesse de disparition des activités enzymatiques en fonction du nombre de liaisons peptidiques coupées (voir figure 5).

A partir des données précédentes, il est possible de déterminer les constantes de dissociation AMP-GPDH en utilisant la méthode de Jacobs et Cunningham (116). Si la formation du complexe enzyme-substrat est décrite par l'équation,



$$(1) \frac{d(EL)}{dt} = k_1(E)(L) - k_{-1}(EL)$$

E = concentration en apoenzyme ; à l'équilibre $\frac{d(EL)}{dt} = 0$

$$(2) (E) \frac{k_{-1}(EL)}{k_1(L)} = K_D \frac{[EL]}{[L]}$$

$E = (E_t) - (EL)$; E_t = concentration totale de l'enzyme.

$$(EL) = \frac{(E_t)(L)}{K_D} - \frac{(EL)(L)}{K_D}$$

$$(3) \text{ soit } \frac{1}{(EL)} = \frac{K_D}{(E_t)(L)} + \frac{1}{(E_t)}$$

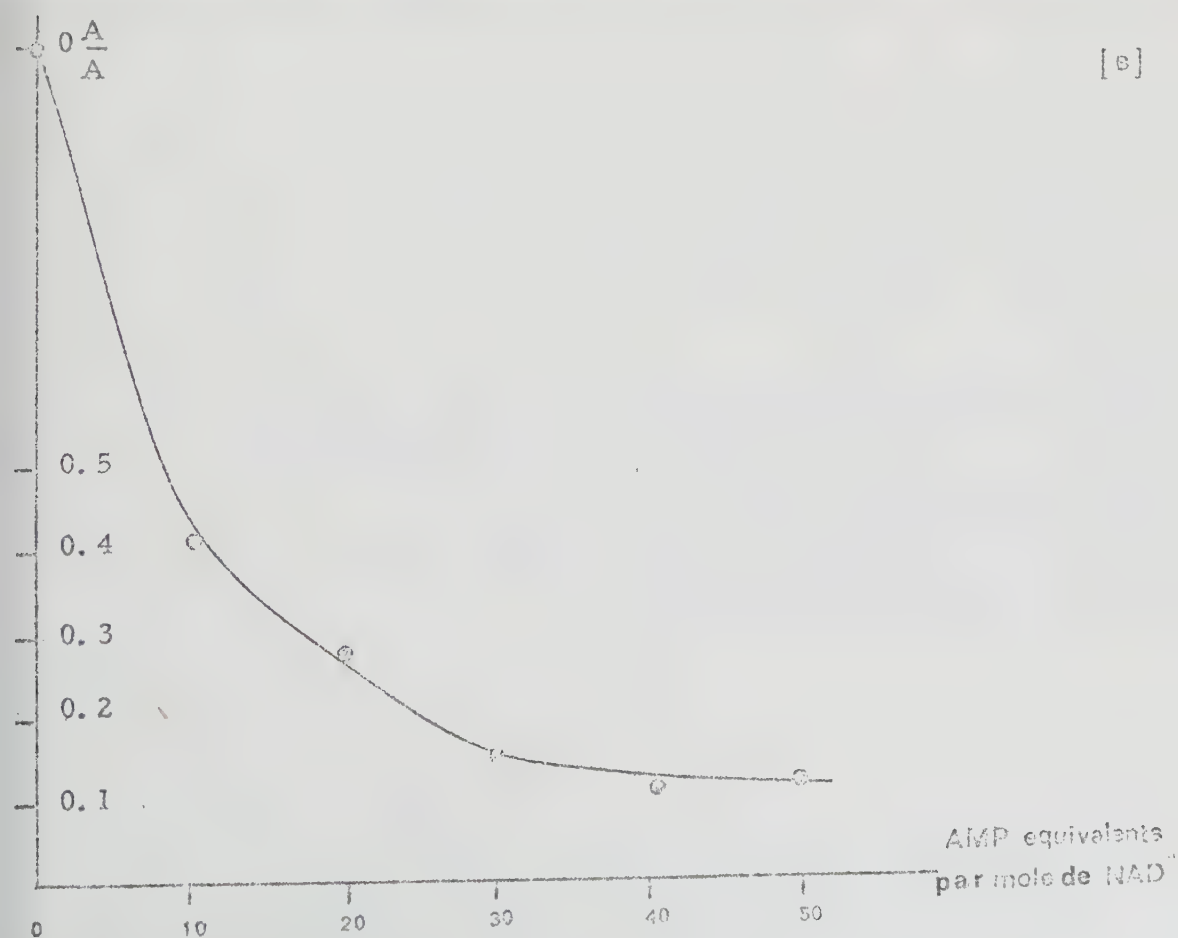
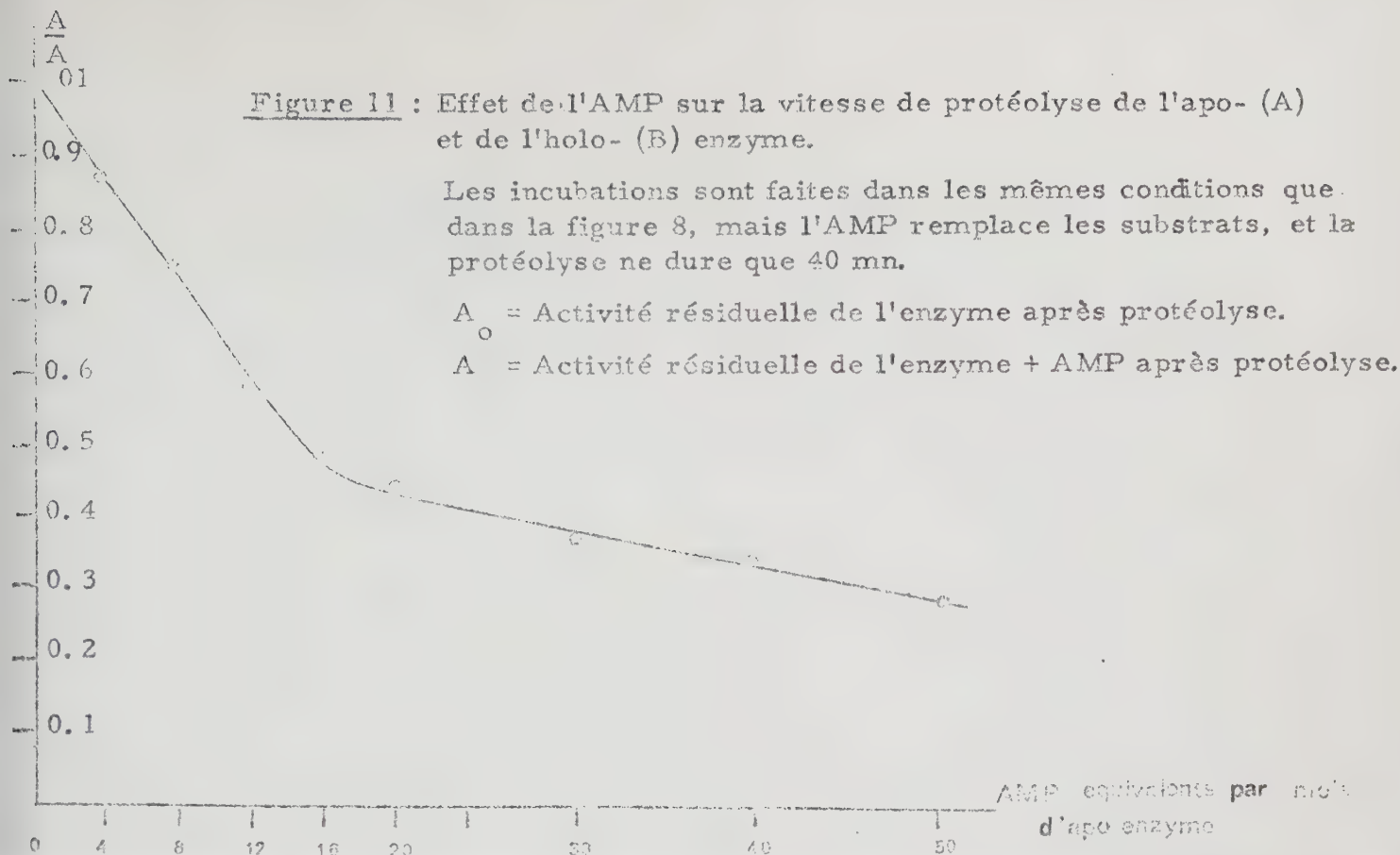
si l'augmentation de la vitesse de protéolyse chymotrypsique, mesurée par la valeur $(A_0 - A)$ est proportionnelle à la concentration de complexe présent $[E-L]$, On peut, en représentant $A_0 - A$ en fonction de (L) selon la représentation de Lineweaver et Burk, obtenir une valeur pour la constante de dissociation apparente du complexe AMP-Enzyme (Fig. 11 A). Dans ce cas particulier,

Figure 11 : Effet de l'AMP sur la vitesse de protéolyse de l'apo- (A) et de l'holo- (B) enzyme.

Les incubations sont faites dans les mêmes conditions que dans la figure 8, mais l'AMP remplace les substrats, et la protéolyse ne dure que 40 mn.

A_0 = Activité résiduelle de l'enzyme après protéolyse.

A = Activité résiduelle de l'enzyme + AMP après protéolyse.



[6]

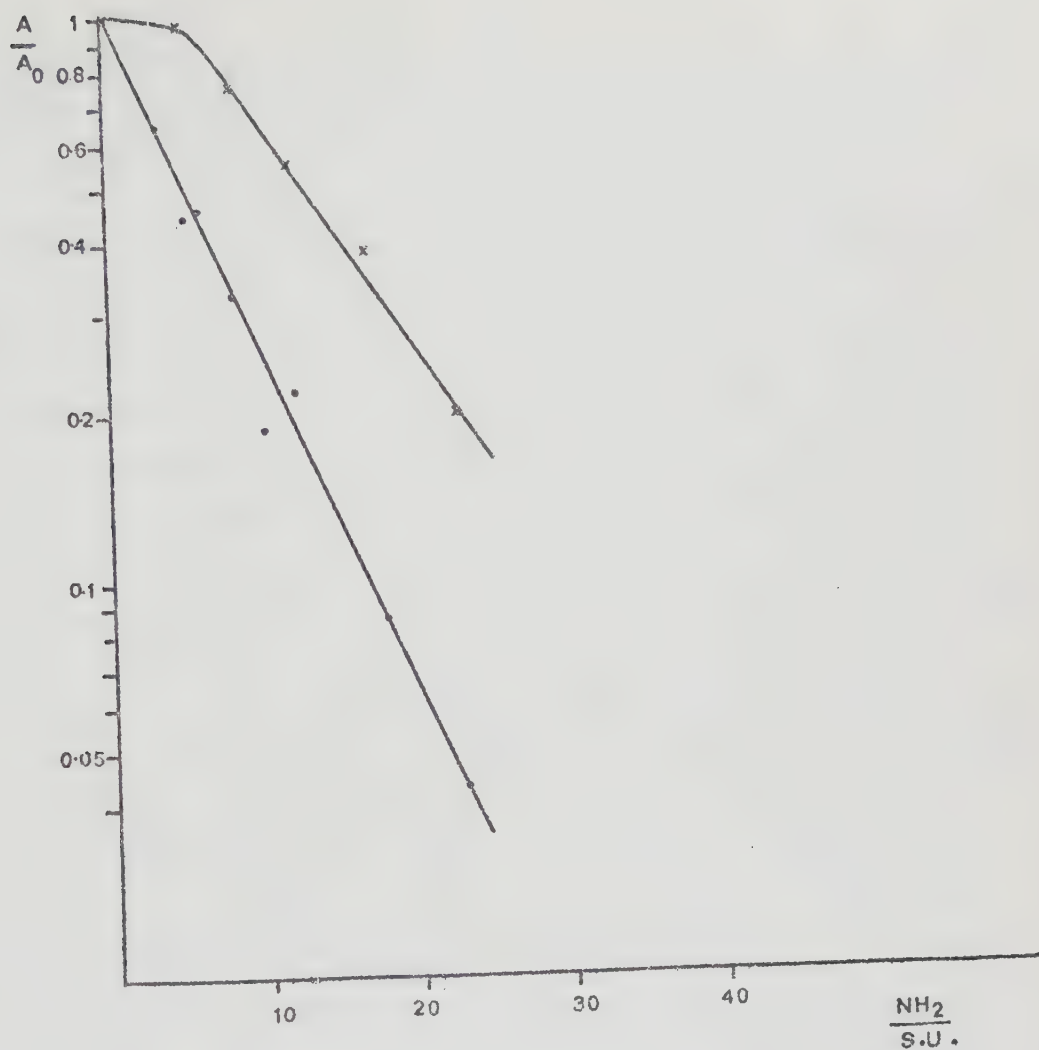


Figure 12 : Lien entre les activités oxydante et arsenylante résiduelle et le nombre de liaisons peptidiques coupées.

A = activité résiduelle pour n liaisons peptidiques hydrolysées.

A_0 = activité initiale de l'enzyme.

—•— Activité arsenylante ;

—x— Activité oxydante.

étant donné la possibilité de faire la détermination du K_D AMP par fluorescence comme on va le voir plus loin, il est intéressant de comparer les valeurs obtenues par les deux méthodes.

2) Effet des ligands sur les propriétés physico-chimiques de la GPDH.

a/ Fluorescence : Emission de fluorescence à 340 nm.

La GPDH comme toutes les protéines contenant du tryptophane manifeste un spectre d'émission de fluorescence dont le maximum est centré entre 335 et 340 nm pour une excitation à 290 nm. Le NAD^+ ajouté à l'apoenzyme provoque une diminution d'intensité de cette bande. La figure 13 montre nos résultats lorsque l'on ajoute progressivement le NAD^+ à l'apoenzyme. Entre 3 et 4 équivalents de NAD^+ par molécule d'enzyme on parvient à un plateau, au-delà de cette valeur on n'observe plus de variation de fluorescence. A partir de cette mesure il est possible de déterminer la constante de dissociation NAD^+ -Enzyme par la représentation de Lineweaver et Burk (83).

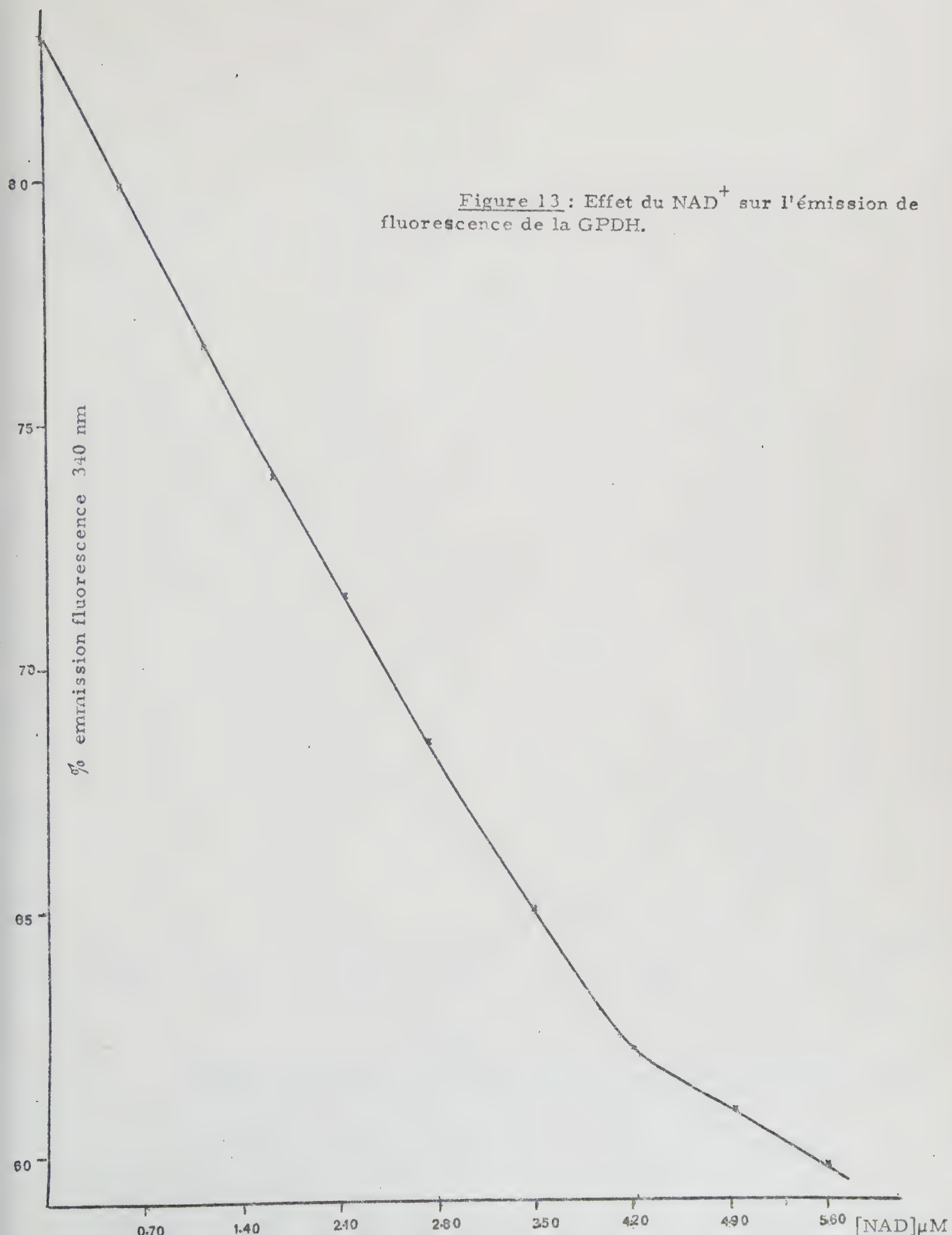
Une expérience identique est reprise en présence d'AMP (fig. 14). L'AMP a le même effet que le NAD^+ . A partir de cet effet, on peut déterminer une constante de dissociation $K_{AMP} = 2,2 \pm 0,1 \cdot 10^{-4} M$.

Le glycéraldéhyde-3-phosphate provoque également une faible diminution de la fluorescence émise par le tryptophane ; ce phénomène a déjà été observé pour la GPDH de muscle de porc par Keleti (26).

b/ Dispersion rotatoire :

L'effet du NAD^+ sur la dispersion rotatoire optique de la GPDH de muscle de lapin a déjà été mise en évidence et étudiée en particulier par Listowsky et al. (27), puis par Jaenicke et al. (29). Nous trouvons pour l'apo- et l'holoenzyme des valeurs pour les paramètres a_0 et b_0 proches de celles de Listowsky (tableau IX).

Figure 13 : Effet du NAD^+ sur l'émission de fluorescence de la GPDH.



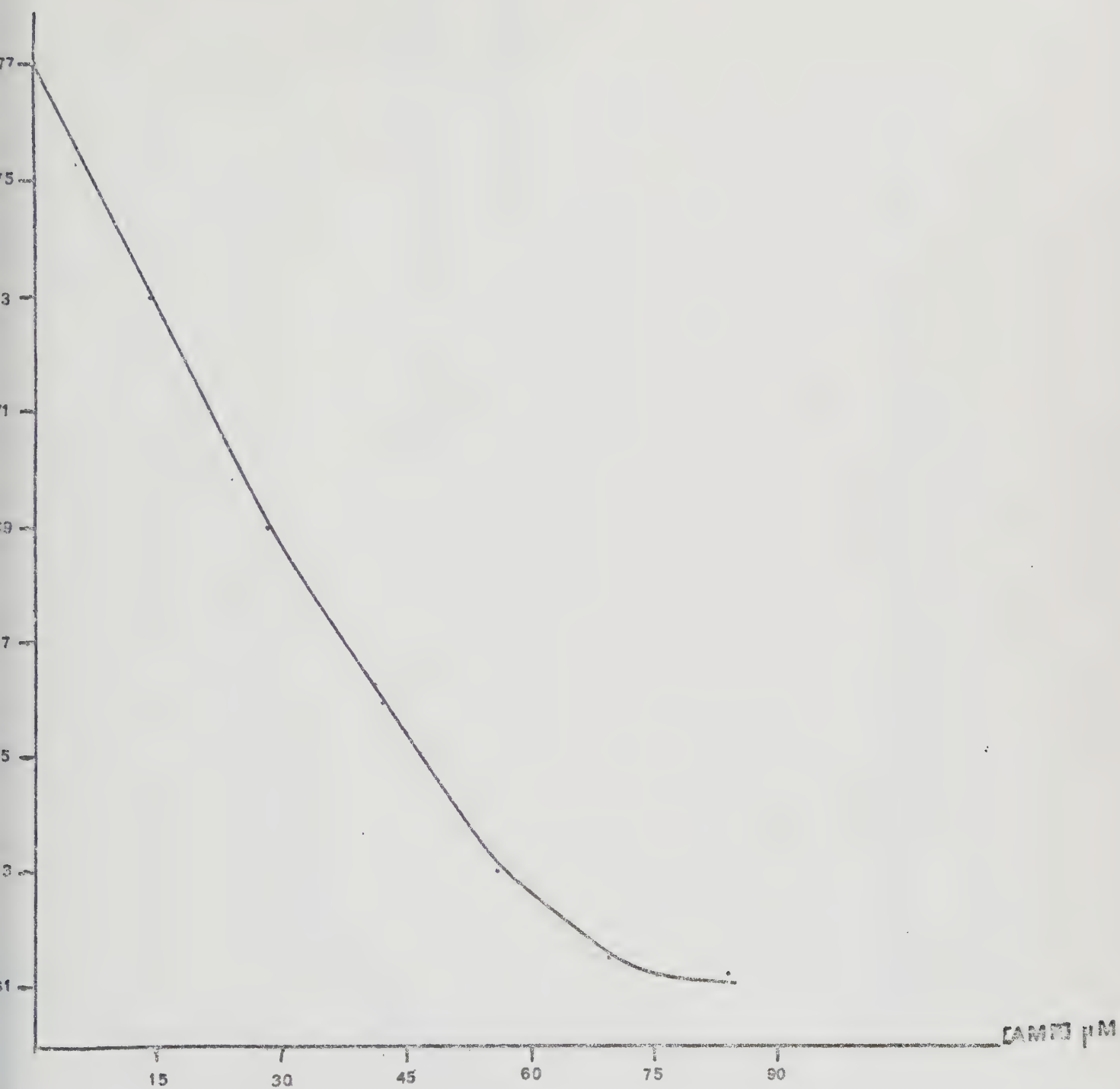


Figure 14 : Effet de l'AMP sur l'émission de fluorescence de la GPDH.

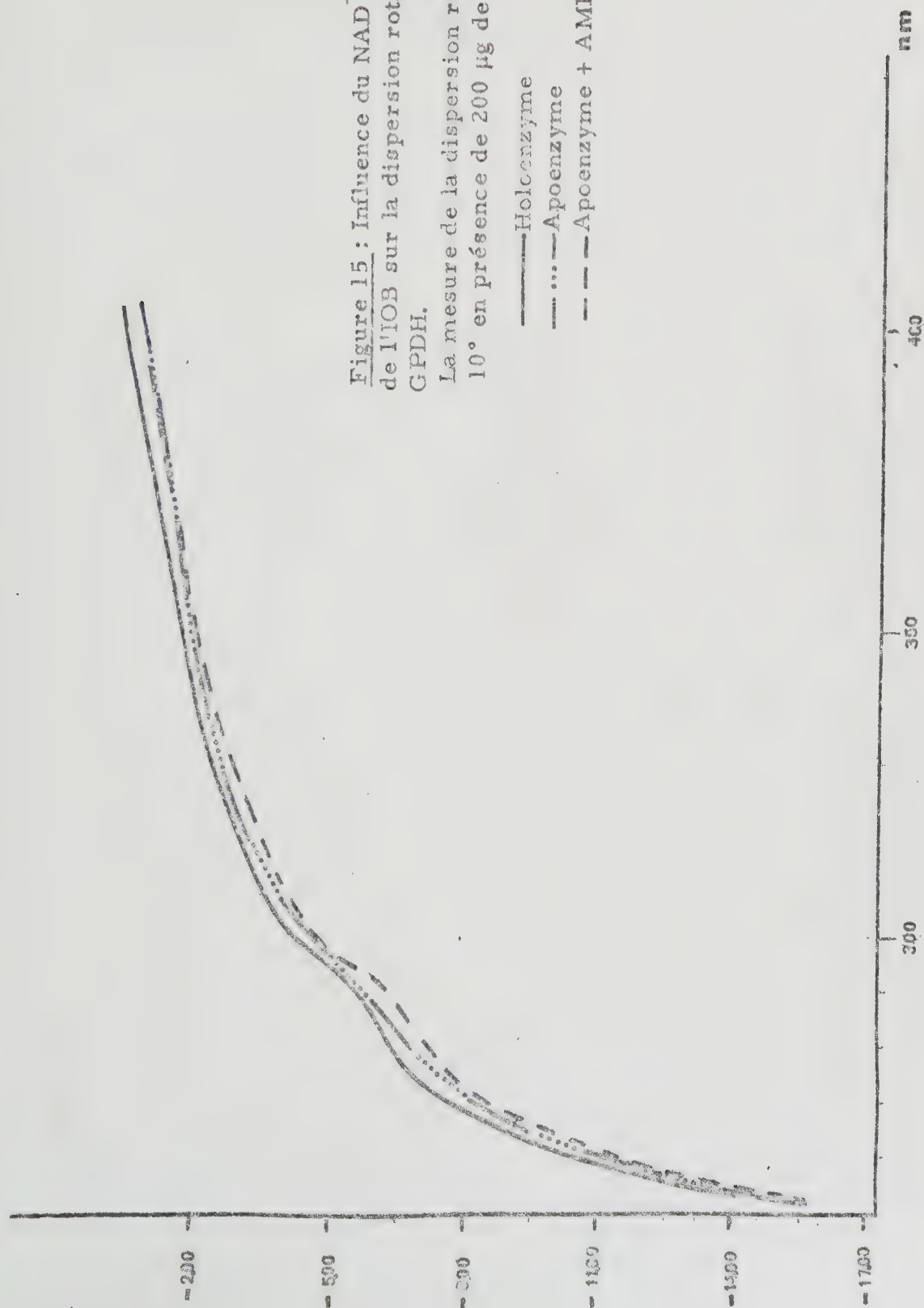


Figure 15 : Influence du NAD⁺, de l'AMP, et de l'IOB sur la dispersion rotatoire de la GPDH.

La mesure de la dispersion rotatoire a lieu à 10° en présence de 200 µg de GPDH/ml.

— Holcoenzyme
 ... Apoenzyme
 --- Apoenzyme + AMP

La détermination des constantes a été faite avec une calculatrice Wang. Un premier programme permet de déterminer $[M']$ à chaque longueur d'onde de mesure et d'obtenir une relation du type $y = bx + a$:

$$[M'] [\lambda^2 - \lambda_o^2] = a_o \lambda_o^2 - b_o \lambda_o^4 \frac{1}{\lambda^2 - \lambda_o^2}$$

dans laquelle $a = a_o \lambda_o^2$, $b = b_o \lambda_o^4$ et $x = \frac{1}{\lambda^2 - \lambda_o^2}$

Un second programme de régression linéaire de la fonction y permet d'obtenir la meilleure représentation linéaire pour déterminer a_o et b_o .

Tableau IX: Valeurs des paramètres de dispersion rotatoire optique.

	a_o	b_o
Apoenzyme	238	140
Holoenzyme	134	246

La présence de NAD^+ d'autre part accentue l'effet Cotton entre 270 et 300 nm que l'on décèle déjà dans l'apoenzyme. La figure 15 montre que l'AMP fait apparaître un effet Cotton identique à celui du NAD^+ .

Le marquage de l'holoenzyme par l'acide o-iodosobenzoïque (5 équivalents par mole) entraîne la disparition de cet effet.

Discussion

Le glycéraldéhyde-3-phosphate est capable d'interagir avec la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase. Keleti (26) dans l'enzyme de muscle de porc a déjà observé par fluorescence l'interaction entre le glycéraldéhyde-3-phosphate et l'apoenzyme. Nous avons également observé un phénomène de quenching dans l'enzyme de muscle de lapin. Au contraire, le D-glycéraldéhyde, qui ne diffère du substrat naturel que par l'absence du phosphate en position 3 n'a aucun effet de protection sur l'enzyme. Ce résultat est à rapprocher de ceux obtenus dans notre laboratoire (Traore, Thèse de 3ème Cycle) qui montrent une protection de la GPDH vis à vis de l'action du TNBS (modifiant les $-NH_2$ de l'enzyme) (67) lorsque la réaction a lieu en présence de glycéraldéhyde-3-phosphate, mais aucune si le D-glycéraldéhyde est présent. D'autre part, la vitesse d'oxydoréduction du substrat naturel est 100 fois plus rapide que celle du D-glycéraldéhyde. Tous ces résultats

indiquent que, en dehors du groupement carbonyle qui est essentiel dans la fixation du substrat, le phosphate en position 3 du glycéraldéhyde-3-phosphate joue un rôle dans la fixation du substrat et dans la conformation de l'enzyme.

- Effet du NAD^+ : La présence de 2 équivalents de coenzyme par mole d'enzyme entraîne une protection totale de la GPDH vis à vis de l'action de la chymotrypsine. D'après nos résultats de fluorescence, et ceux d'autres auteurs (25), on peut considérer que le coenzyme présent dans le milieu interagit stoechiométriquement avec l'enzyme, jusqu'à la fixation du 3e NAD^+ ; cependant la fluorescence ne permet pas de différencier le rôle joué par les trois NAD^+ liés à l'enzyme. La protection de la GPDH au cours de la protéolyse au contraire permet de montrer que les deux premières moles de coenzyme liées entraînent le passage de la structure de l'apoenzyme à celle de l'holoenzyme. Ce résultat est en accord avec celui de Listowsky et al. (27) : son étude de la GPDH en dispersion rotatoire optique indique en effet que pour 2 moles de NAD^+ par mole d'enzyme, les paramètres a_0 et b_0 passent des valeurs caractérisant l'apoenzyme à celles de l'holoenzyme. D'autre part ceci est en faveur de l'hypothèse de Conway et Koshland selon laquelle le rôle des coenzymes serait double : les deux premiers NAD^+ liés donneraient à l'enzyme la conformation la plus favorable à la formation du complexe ternaire E- NAD^+ -substrat, les deux derniers moins fortement liés joueraient un rôle essentiellement catalytique (30).

- Interaction NADH-Enzyme : Le NADH au contraire n'a aucune influence sur la protéolyse de l'apoenzyme ; il ne provoque pas de changement de conformation de l'apoenzyme comparable à celui qui est induit par le NAD^+ .

Bolotina et al. (28) dans l'enzyme de muscle de porc avaient déjà montré que la GPDH en présence de NADH conserve les paramètres de dispersion rotatoire optique caractéristiques de l'apoenzyme.

La réduction du noyau nicotinamide en position 4 suffit à modifier totalement l'interaction coenzyme-GPDH. L'hypothèse la plus vraisemblable est que le noyau nicotinamide passe d'une forme planaire à une forme "bateau" lorsque le noyau aromatique est réduit, ce qui peut changer de façon importante les interactions entre le nicotinamide et le centre actif (25).

- Interaction AMP-Enzyme : Le résultat le plus intéressant est l'effet de l'AMP. La présence de ce nucléotide accélère la réaction de protéolyse sans en modifier la sélectivité puisque la relation $\frac{\text{activité arsenylante}}{\text{activité oxydante}}$ reste identique à celle que l'on mesure lorsque l'hydrolyse chymotrypsique est faite sur l'apoenzyme seul. Les ruptures des liaisons peptidiques sont plus sélectives puisque le nombre de ruptures nécessaires pour abaisser l'activité oxydante est plus faible ; on peut faire à ce sujet deux types d'interprétations qui ne sont d'ailleurs pas incompatibles :

- 1) l'augmentation de la vitesse de la protéolyse diminue le temps d'action de la chymotrypsine et le nombre de coupures non spécifiques.
- 2) l'AMP interagit avec la fraction oxydante et la protège d'une hydrolyse plus poussée.

La constante de dissociation apparente, calculée à partir de la sensibilisation vis à vis de la protéolyse est $K_D \text{ AMP} = 1,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Par la diminution de l'émission de fluorescence à 340 nm provoquée par l'AMP, la valeur de K_D obtenue est $2,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Ces valeurs concordent. La protéolyse est d'ailleurs un moyen assez généralement utilisé pour mesurer des interactions effecteurs-enzyme (créatine kinase, aldolase, hexokinase). Les valeurs des constantes obtenues par la méthode de protéolyse sont du même ordre que celles que l'on déduit d'autres méthodes (en tenant compte du fait que la protéolyse est cependant beaucoup moins précise, que des méthodes physico-chimiques) (117).

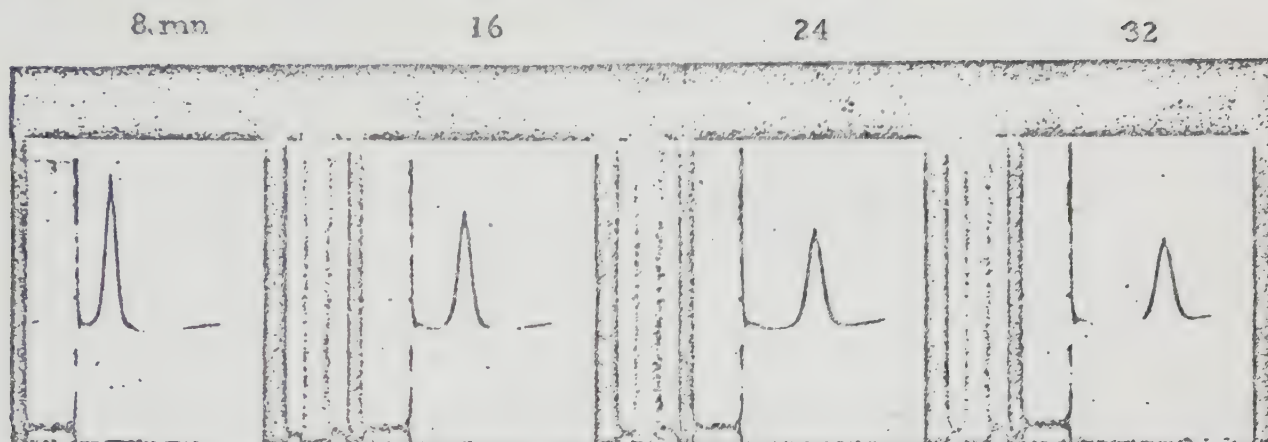
La présence d'AMP permet de faire disparaître la protection apportée par 2 moles de NAD^+ à la GPDH vis à vis de la chymotrypsine. L'AMP et le NAD^+ provoquent dans la zone 300 à 270 nm le même effet Cotton. Ces résultats (cinétiques, d'émission de fluorescence et de dispersion rotatoire optique), suggèrent que les deux nucléotides ont en commun certains points de fixation sur l'enzyme, en particulier le noyau adénylique. La possibilité d'un site de fixation commun à l'AMP et le NAD^+ a d'ailleurs déjà été envisagée par différents auteurs (42, 43, 44, 45), car l'inhibition de l'activité arsenylante par l'AMP est de type mixte (42, 43) ou compétitif (44, 45) vis à vis du NAD^+ , selon l'origine de la GPDH.

Le NMN n'a aucune influence sur la protéolyse et ajouté à l'AMP il ne modifie pas le comportement de la GPDH au cours de la protéolyse. La protection de l'enzyme assurée par le NAD^+ nécessite l'intégrité du coenzyme.

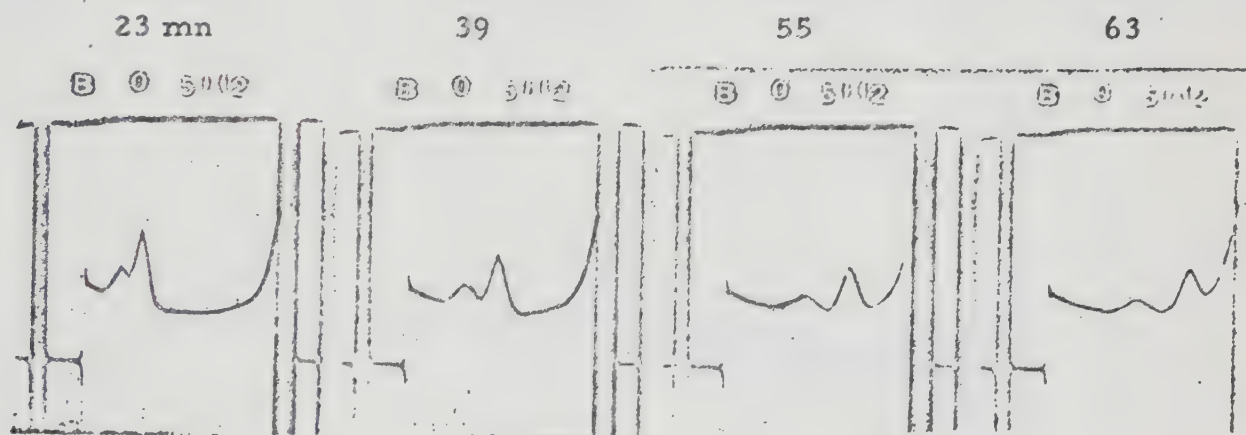
- Effet de l'acide o-iodosobenzofique : l'oxydation de la GPDH, par l'acide iodosobenzofique empêche le NAD^+ d'assurer à l'enzyme la structure de l'holoenzyme, même lorsque 8 NAD^+ par mole sont présents ; d'autre part, l'effet Cotton entre 270 et 300 nm disparaît lorsqu'à l'holoenzyme on ajoute l'agent oxydant. Dans la mesure où le NAD^+ est nécessaire à l'activité phosphatasique sans pour autant participer à la catalyse, on doit penser qu'il a essentiellement un rôle conformationnel. La conformation de l'holoenzyme oxydé est différente de celle de l'holoenzyme natif, bien que dans les deux cas le coenzyme interagisse avec la GPDH.

Figure 16 : Ultracentrifugation.

A) Enzyme natif (67.770 r. p. m., cellule de 10 mm)



) Protéolysat (67.770 r. p. m., cellule de 10 mm)



) Fraction oxydante après chromatographie (50.740 r. p. m., cellule de 30 mm)

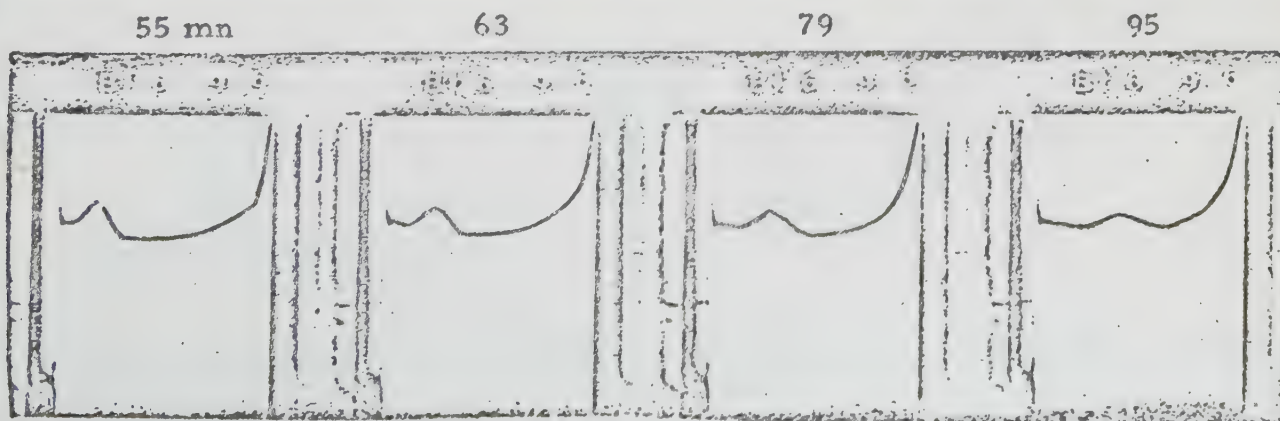
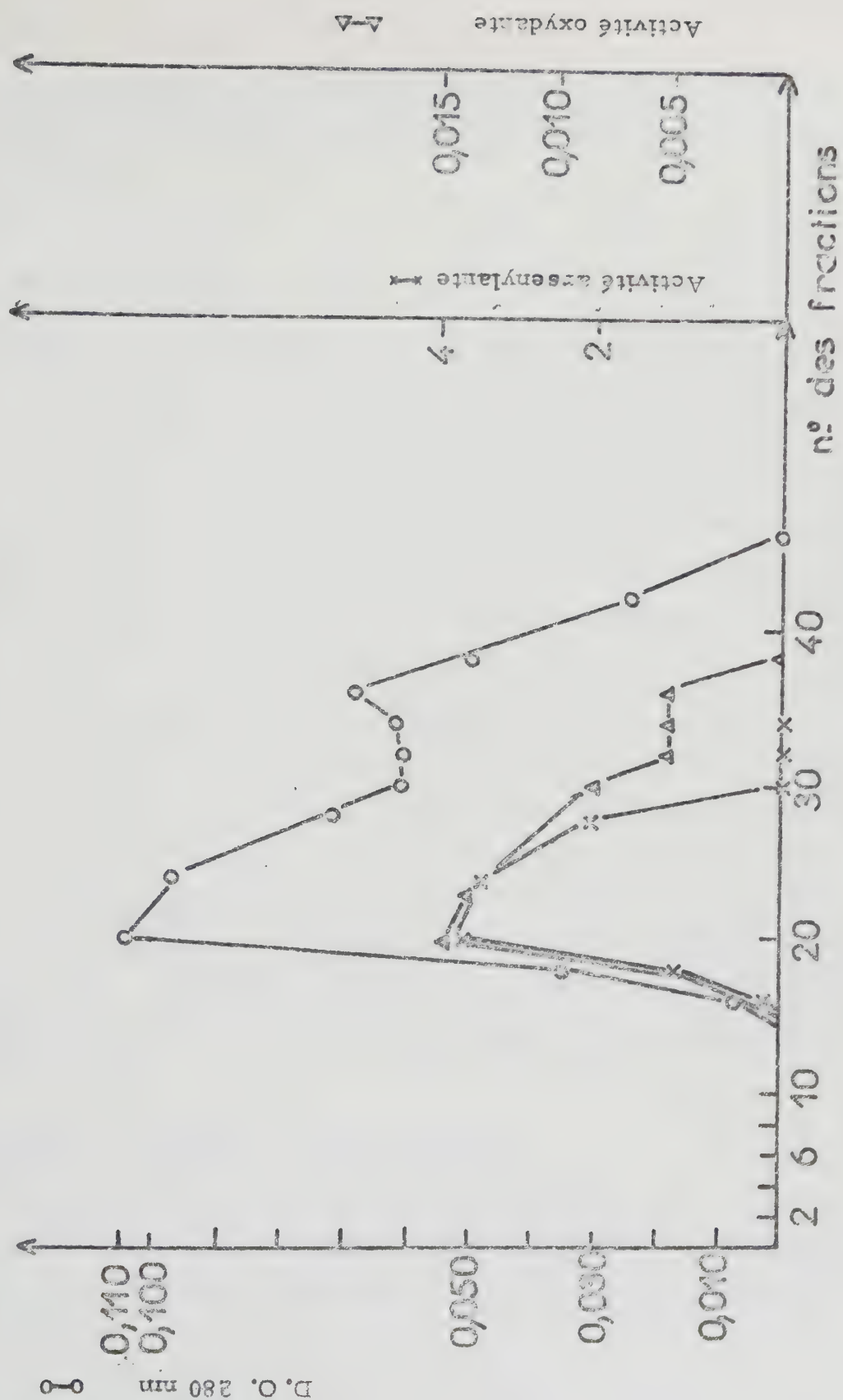


Figure 17 : Gradient de sédimentation analytique



III - DEMONSTRATION DE L'EXISTENCE D'UNE NOUVELLE FRACTION PROTEIQUE DE HAUT POIDS MOLECULAIRE, FORMEE AU COURS DE LA PROTEOLYSE.

1) Méthodes analytiques.

a/ Ultracentrifugation.

L'ultracentrifugation de la GPDH native et protéolysée montre qu'au cours de la réaction, une fraction de poids moléculaire plus faible que celui de la GPDH s'est formé (fig. 16). Le $S_{0W,20}$ de l'enzyme natif est de 7,1. Pour le protéolysat brut on trouve deux constituants dont les coefficients de sédimentation sont respectivement 6,60 et 4,40 S. Krimsky et Racker (12) avaient déjà mis en évidence par gradient de sédimentation de saccharose entre 5 et 20 % la formation d'une fraction de 4,83 S pendant l'hydrolyse par la chymotrypsine.

b/ Gradient de sédimentation analytique en saccharose.

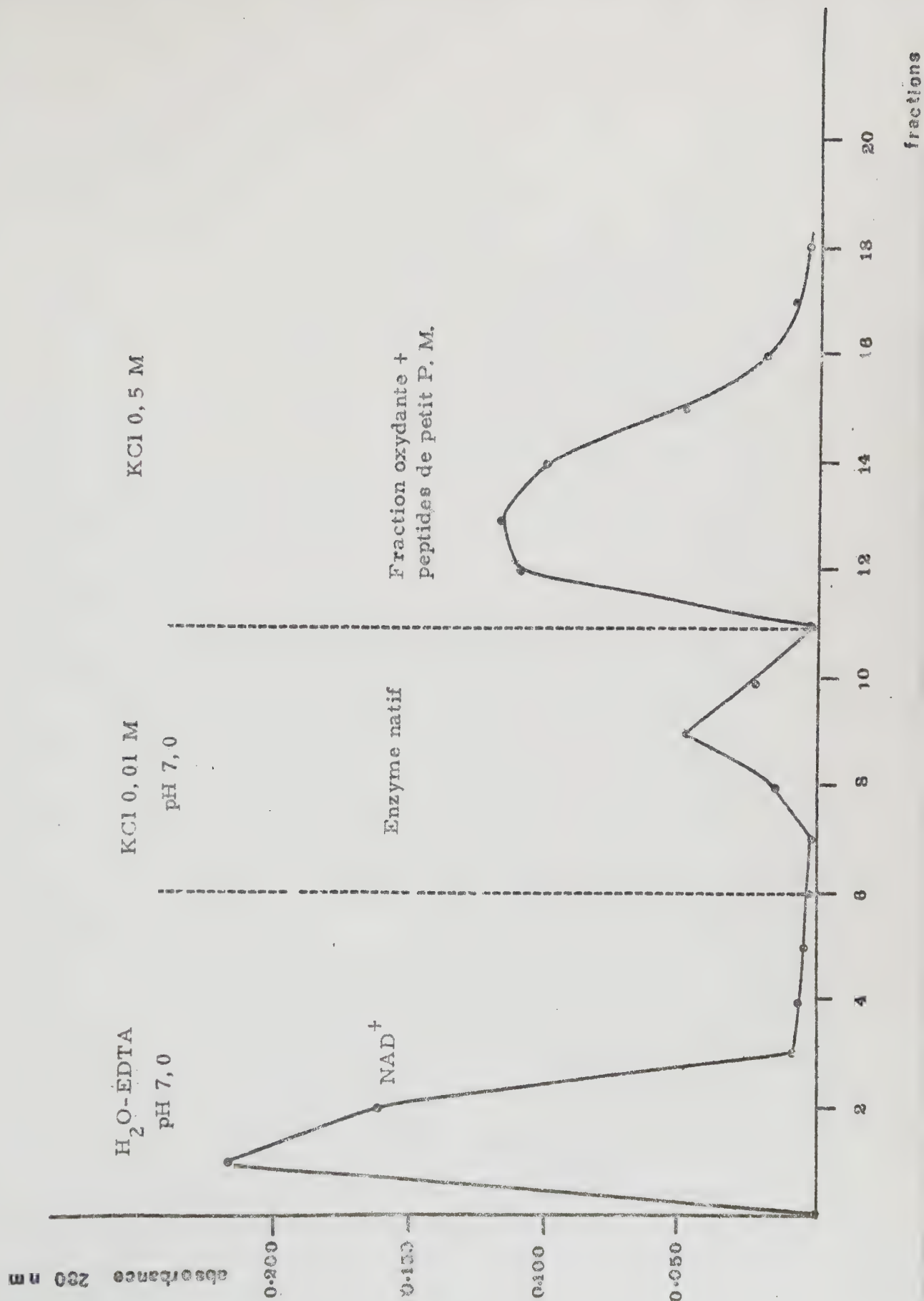
L'ultracentrifugation analytique ne permet pas de montrer si la fraction formée possède une activité enzymatique. Un gradient de sédimentation entre 5 et 20 % de saccharose permet de séparer deux fractions (fig. 17) : l'une qui se déplace au niveau de l'enzyme natif et possède les mêmes propriétés, l'autre dont l'activité arsenylante est comprise entre 5 et 1 % et l'activité oxydante résiduelle égale à 33 % par mg de protéine. Cependant la séparation est trop faible entre les deux constituants pour envisager une purification par un gradient préparatif.

2) Isolement préparatif de la fraction oxydante.

a/ Séparation sur colonne de phospho-cellulose :

La séparation sur colonne de phospho-cellulose déjà décrite par Krimsky et Racker (12), semblait très séduisante, car elle permettait d'éliminer le NAD^+ ,

Figure 18: Colonne de Phospho-cellulose (1 x 3 cm)



Légende de la Figure 19 :

L'activité oxydante résiduelle est comprise entre 65 et 70 %, l'activité arsénolytique entre 25 et 30 %.

A la fin des protéolyses l'action de la chymotrypsine est stoppée par 50 μ l de DFP, l'enzyme est stabilisé par NAD^+ 0,8 mM et placé à 0°. 50 mg de glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase sont déposés sur la colonne, dont le débit est de 15 ml/heure. Le volume des fractions est de 4 ml.

Profil d'élution de 1) l'apoenzyme

2) l'enzyme - 100 équivalents D-glycéraldéhyde

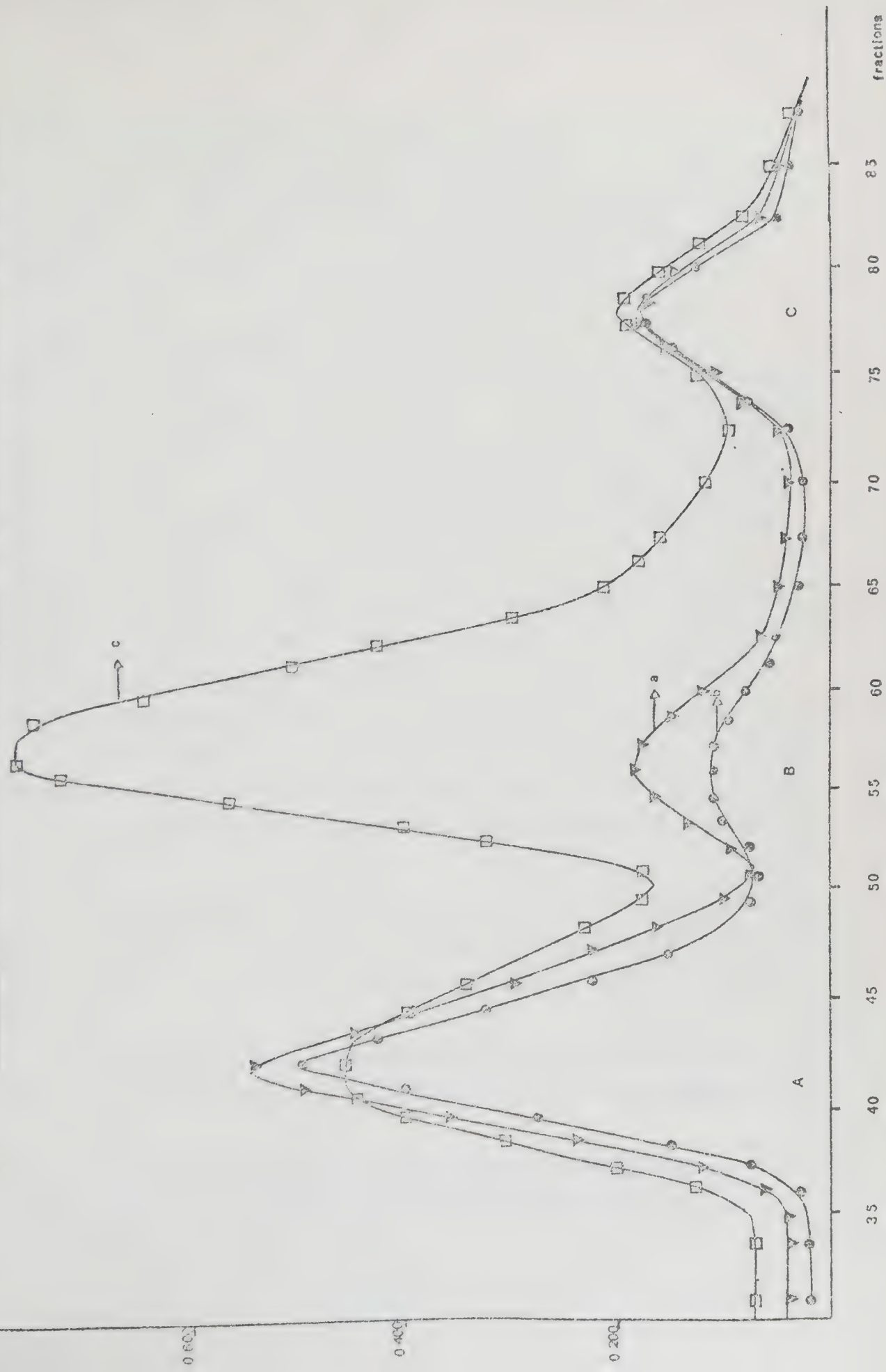
3) l'enzyme - 20 équivalents NADH.

Profil d'élution de l'apoenzyme modifié par l'o-iodosobenzoate

Profil d'élution de l'enzyme - 20 équivalents AMP.

OD 230 nm

Figure 19 : Rendement en fraction oxydante en fonction des conditions de protéolyse.



l'enzyme natif, enfin les fraction plus chargées, dont la fraction oxydante (fig. 18). En fait cette méthode présente plusieurs défauts : l'activité oxydante résiduelle après la séparation est beaucoup plus faible que lors d'un gradient de sédimentation. D'autre part on ne sépare pas la fraction oxydante des peptides de petit poids moléculaire libérés pendant la protéolyse.

b/ Séparation sur gel de Séphadex G 100 :

La figure 19 montre le profil chromatographique obtenu. On sépare trois pics A, B, C, de haut poids moléculaire et un pic non représenté sur la figure 19, correspondant aux peptides de faible poids moléculaire formés au cours de la protéolyse. Les pics A et B seront étudiés plus loin. Le pic C représente la DIP-chymotrypsine ; son activité estérasique résiduelle mesurée par l'ATEE est nulle (blocage par le DFP).

- Identification du pic A : Le déplacement chromatographique du pic A est identique à celui de l'enzyme natif. Une rechromatographie de ce pic sur la même colonne de Séphadex permet d'obtenir un enzyme dont les propriétés enzymatiques sont celles de la GPDH soumise aux mêmes traitements :

- . les activités arsenylante et phosphorylante sont toujours présentes et de même valeur que celles de l'enzyme natif (fig 20 A et B) ;

- . le NADH inhibe la réaction arsenylante pour le pic A comme pour l'enzyme natif ;

- . Lors d'un passage sur une colonne de séphadex, le coenzyme est retenu aussi bien sur le pic A que sur l'enzyme natif ; le rapport 280/260 nm est compris entre 1,10 et 1,20 dans les deux cas après chromatographie sur colonne ;

- . Dans l'enzyme natif on dose 3,2 à 4 équivalents de groupements sulfhydriles par mole en 3 minutes ; dans le pic A, on en dose rapidement 10,4.

- . L'analyse des N-terminaux par dansylation met en évidence la présence de 4 valines N-terminales et 4 acides aspartiques N-terminaux.

Figure 20 : Activités arsenylante, phosphorylante et oxydante dans l'enzyme natif et la fraction oxydante.

A) Activité arsenylante

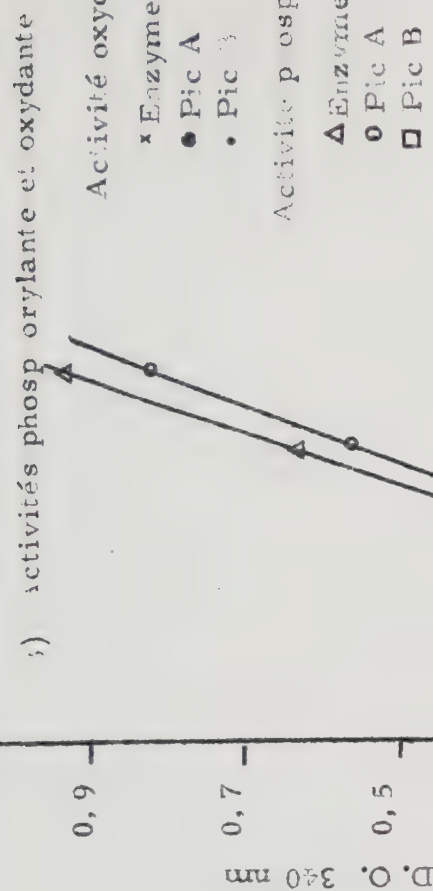
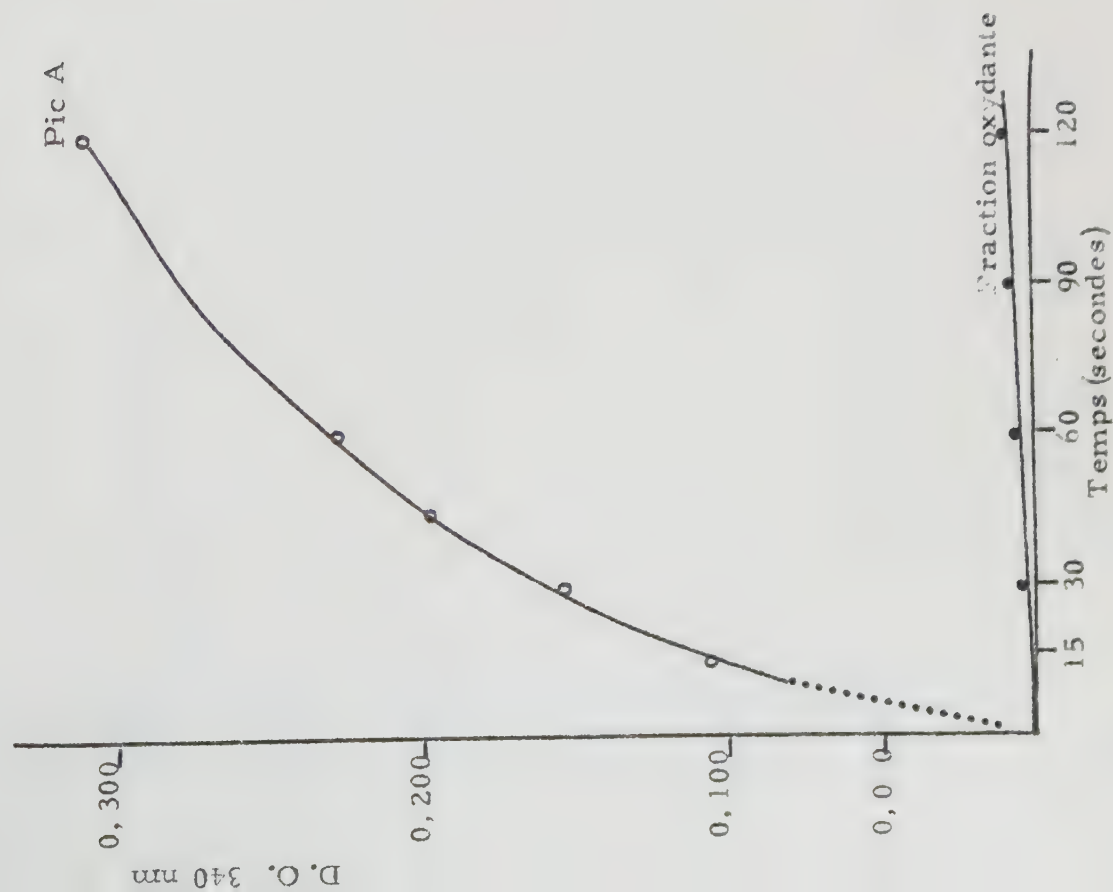
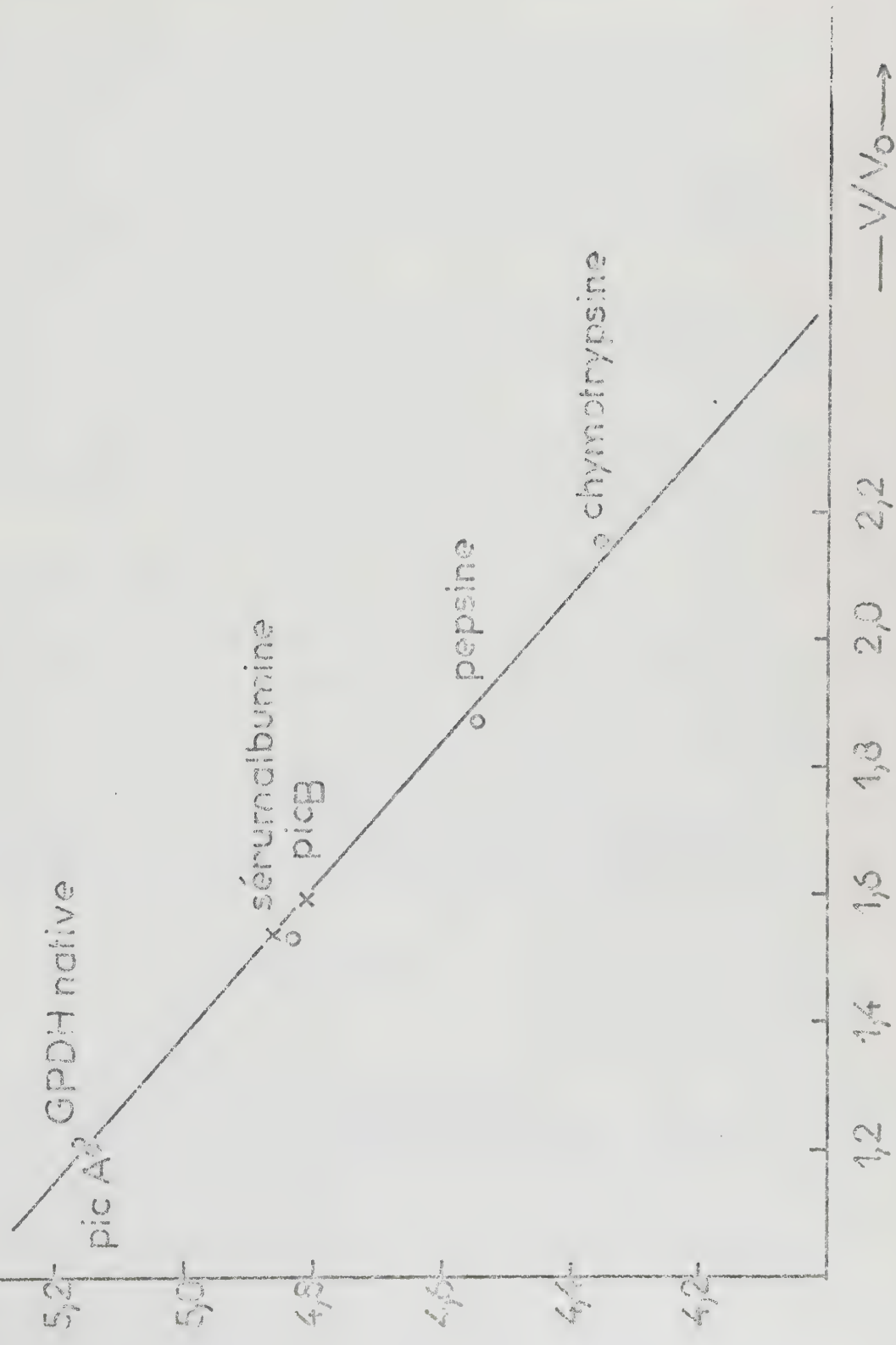


Figure 21 : Détermination des poids moléculaires des pics A et B sur colonne de Séphadex G 100.

○ protéines témoins

● Pic A

x Pic B



Le pic A, malgré de nombreuses analogies, diffère de la GPDH native.

- Identification du pic B : Contrairement au premier pic, le pic B a perdu ses activités arsenylante et phosphorylante (1 à 3 % d'activité résiduelle) mais il a conservé une activité oxydante dont la valeur est comprise entre 30 et 35 % de celle de l'enzyme natif par mg de protéine (fig. 20). Sa vitesse de réaction est constante pendant la cinétique, contrairement à celle de la GPDH qui comporte deux vitesses (voir discussion).

Nous avons appelé ce pic "fraction oxydante". On peut estimer son poids moléculaire à 65.000 ± 5.000 (fig. 21), par filtration sur gel de Séphadex G 100 analytique, avec une colonne de 100 cm x 1 cm.

Ce pic a peu d'affinité pour le NAD^+ ; le coenzyme n'est plus retenu sur l'enzyme lors d'une chromatographie sur gel de séphadex G 100 (114).

3) Rendement en fraction oxydante.

Le calcul du rendement théorique en fraction oxydante tient compte du fait que 1) le pourcentage d'activité arsenylante résiduelle est très sensiblement égal au pourcentage de protéines retrouvées dans le pic A, 2) l'on admet pour la fraction oxydante un poids moléculaire égal à 65.000 ± 5.000 .

Si la protéolyse est tout à fait spécifique, toute molécule de GPDH au cours de l'action de la chymotrypsine doit passer par l'étape de la fraction oxydante.

Le rendement théorique maximum est donc égal à :

$$R = ([E] - [A]) \times f$$

[E] = Concentration de GPDH native au début de la réaction

[A] = Concentration d'enzyme non protéolysé déterminée d'après l'activité arsenylante résiduelle.

$([E]-[A])$ = Concentration en enzyme protéolysé.

$$\text{le facteur } f = \frac{65.000}{144.000} = \frac{\text{P. M. fraction oxydante}}{\text{P. M. Enzyme natif}}$$

La figure 19 montre la variation du rendement en fraction oxydante en fonction des conditions de la protéolyse.

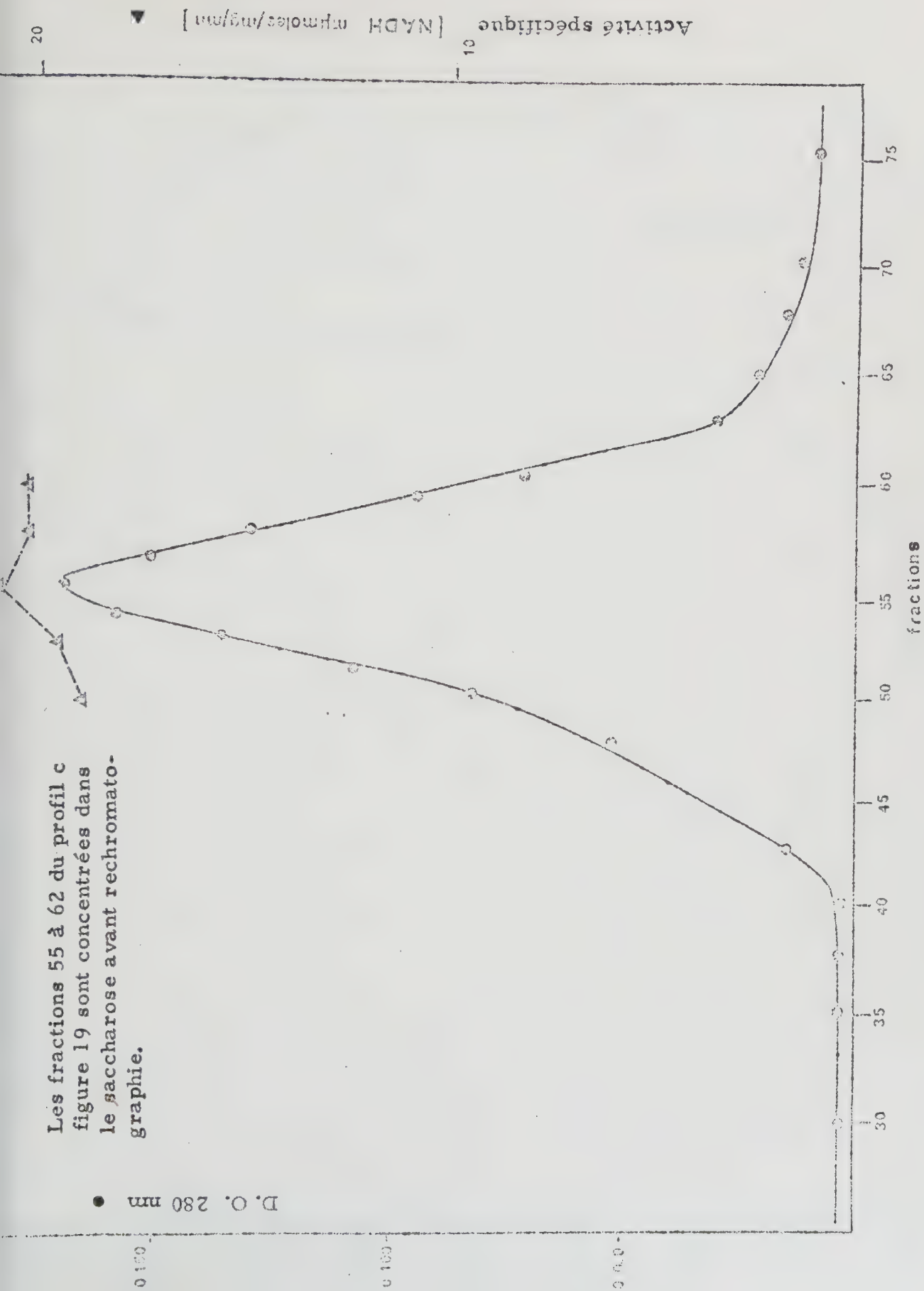
Le profil (a) représente la séparation des différentes fractions obtenues après l'action de la chymotrypsine sur l'apoenzyme seul ou en présence de D-glycéraldéhyde ou de NADH.

Le profil (b) montre la diminution du rendement en fraction oxydante lorsque l'enzyme a été modifié avant protéolyse par l'acide o-iodosobenzofique.

Le profil (c) enfin met en évidence l'effet de l'AMP-5' sur le rendement en fraction oxydante. Celui-ci passe de 16 à 75 % lorsque la protéolyse a lieu en présence d'AMP ; d'autre part, le pourcentage en pic A, vis à vis de la GPDH protéolysé atteint la même valeur que le pourcentage d'activité arsenylante (tableau X).

Tableau X.

		Activité arsenylante %	$\frac{[\text{Pic A}] \%}{[\text{GPDH native}]}$	Rendement en pic B
enzyme	(1)	28	23	16
	(2)	20	24	18
	(3)	22	20	16
apoenzyme + équivalents AMP	(1)	13,8	14	74,4 %
	(2)	11	8	72
	(3)	14	14,4	80,2

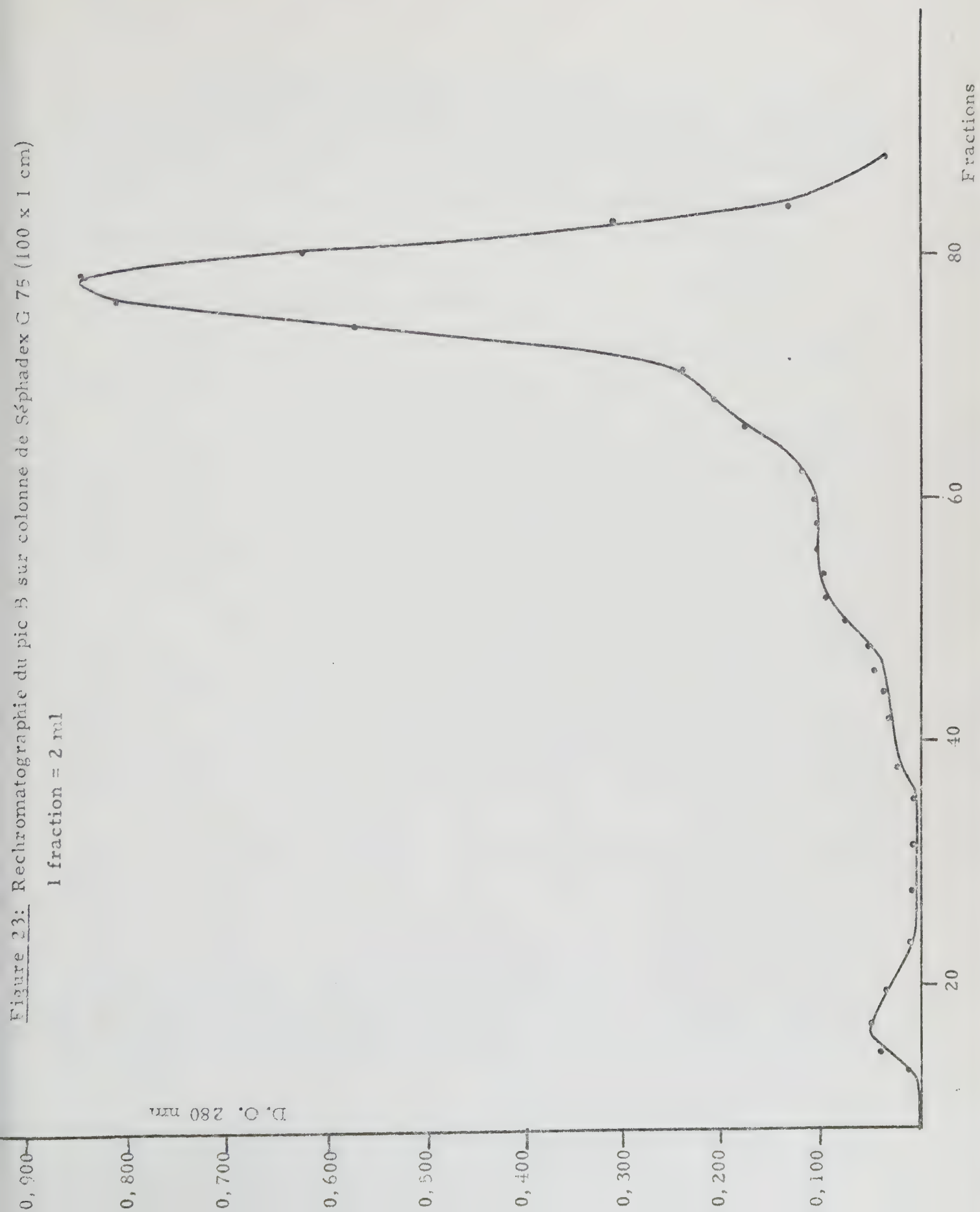


Les fractions 55 à 62 du profil c
 figure 19 sont concentrées dans
 le saccharose avant rechromato-
 graphie.

Figure 22 : Rechromatographie du sommet du pic B sur Séphadex G 100.

Figure 23: Rechromatographie du pic B sur colonne de Séphadex G 75 (100 x 1 cm)

1 fraction = 2 ml



L'augmentation du rendement en fraction oxydante à la suite d'une
protéolyse en présence d'AMP permet d'envisager l'étude de la fraction oxy-
dante purifiée. Nous avons donc dans la suite de ce travail, contrôlé l'homogénéité de la fraction oxydante, et analysé ses propriétés enzymatiques, chimiques et physico-chimiques essentielles.

4) Homogénéité de la fraction oxydante.

L'homogénéité du sommet de la fraction oxydante obtenue à partir d'une protéolyse faite en présence d'AMP a été analysée :

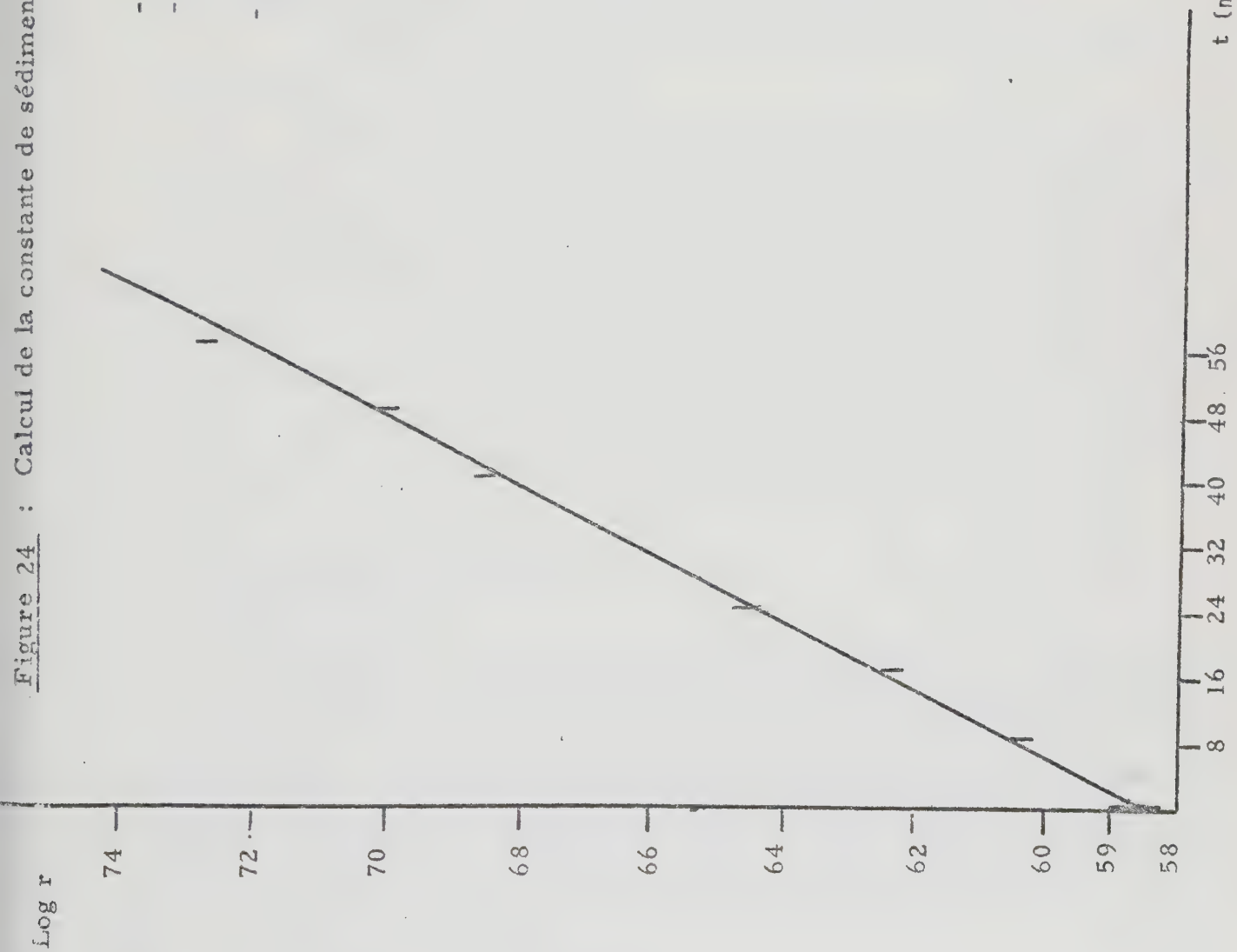
a/ Par rechromatographie sur gel de Sephadex G 100 dans les mêmes conditions que précédemment, on isole un pic dont le déplacement et l'activité spécifique sont ceux de la fraction oxydante isolée au cours de la première chromatographie (fig. 22). Mais on ne recueille à ce niveau que 15 à 20 % des protéines déposées sur la colonne.

On peut attribuer ce faible rendement à la dissociation de la fraction oxydante : si au lieu de rechromatographier cette fraction immédiatement après la première colonne on attend 48 heures, on isole sur colonne de sephadex G 75 analytique une fraction de poids moléculaire compris entre 10.000 et 15.000 (fig. 23). Il n'est donc pas possible d'analyser les propriétés enzymatiques de la fraction oxydante purifiée sur colonne une seconde fois.

b/ Par ultracentrifugation du sommet de la fraction oxydante, on met en évidence la présence d'un seul pic symétrique (fig. 16, 24) dont le $S_{20}^W = 4,4 \pm 0,2$.

La détermination du poids moléculaire par équilibre de sédimentation nécessite des ultracentrifugations à concentration variable ; 500 à 700 $\mu\text{g/ml}$ représentant les concentrations minimum pour les optiques utilisées, une telle détermination nécessiterait la mise au point d'une autre méthode de

Figure 24 : Calcul de la constante de sédimentation.



- Rotor AME - 44.000 r. p. m.

$$- S_{\text{apparent}} = \frac{\text{Log } r}{\omega^2 t}$$

$$- S_{W20} = 4,3 \pm 0,2$$

purification de la fraction oxydante.

c/ Par électrophorèse sur acétate de cellulose, à pH 7, 9, sous 160 volts on détermine un faible déplacement d'une bande homogène vers le pôle négatif.

IV - PROPRIETES DE LA FRACTION OXYDANTE.

A - Analyse préliminaire des acides aminés (tableau XI).

L'analyse a été réalisée sur la fraction oxydante rechromatographiée sur gel de Séphadex G 100.

Le dosage des groupements sulfhydriles a été fait par la méthode d'Ellman, en chlorure de guanidine 5 M. On dose ainsi 8 groupements -SH par mole de fraction oxydante alors qu'on en dose 16 dans l'enzyme natif.

Le dosage des tryptophanes, aussi bien par la méthode de Goodwin et Morton, que par le N-bromosuccinimide permet de montrer la présence de quatre résidus par mole d'enzyme, dans la GPDH on en dose 12 par mole.

L'analyse des autres acides aminés a été faite avec un autoanalyseur Technicon, à la suite d'une hydrolyse acide de la protéine.

B - Propriétés enzymatiques.

1) Activité oxydante.

a/ Constantes de Michaelis-Menten pour le NAD^+ et le D-glycéraldéhyde.
Les valeurs des constantes de Michaelis-Menten pour le NAD^+ et le D-glycéraldéhyde sont obtenues à partir de la représentation de Lineweaver et Burk de l'activité oxydante (fig. 25 et 26). Le tableau XII fait apparaître la différence entre les constantes dans l'enzyme natif et la fraction oxydante.

Tableau XI : Composition de la fraction oxydante en acides aminés.

Acides aminés	Enzyme natif (5) ^x	Fraction oxydante
Lys	108	40
His	40	24
Arg	40	16
Asp	156	60
Thre	88	32
Ser	70	42
Glu	84	58
Pro	52	22
Gly	136	66
Ala	136	70
Cys	16	8
Val	104	70
Meth	36	16
Ileu	72	40
Leu	76	38
Tyr	36	16
Phenylala.	56	27
Tryp.	12	4

^x Corrections faites pour un P. M. = 144.000

Figure 25 : Activité oxydante de la fraction oxydante.
Valeur du K_m NAD^+ .

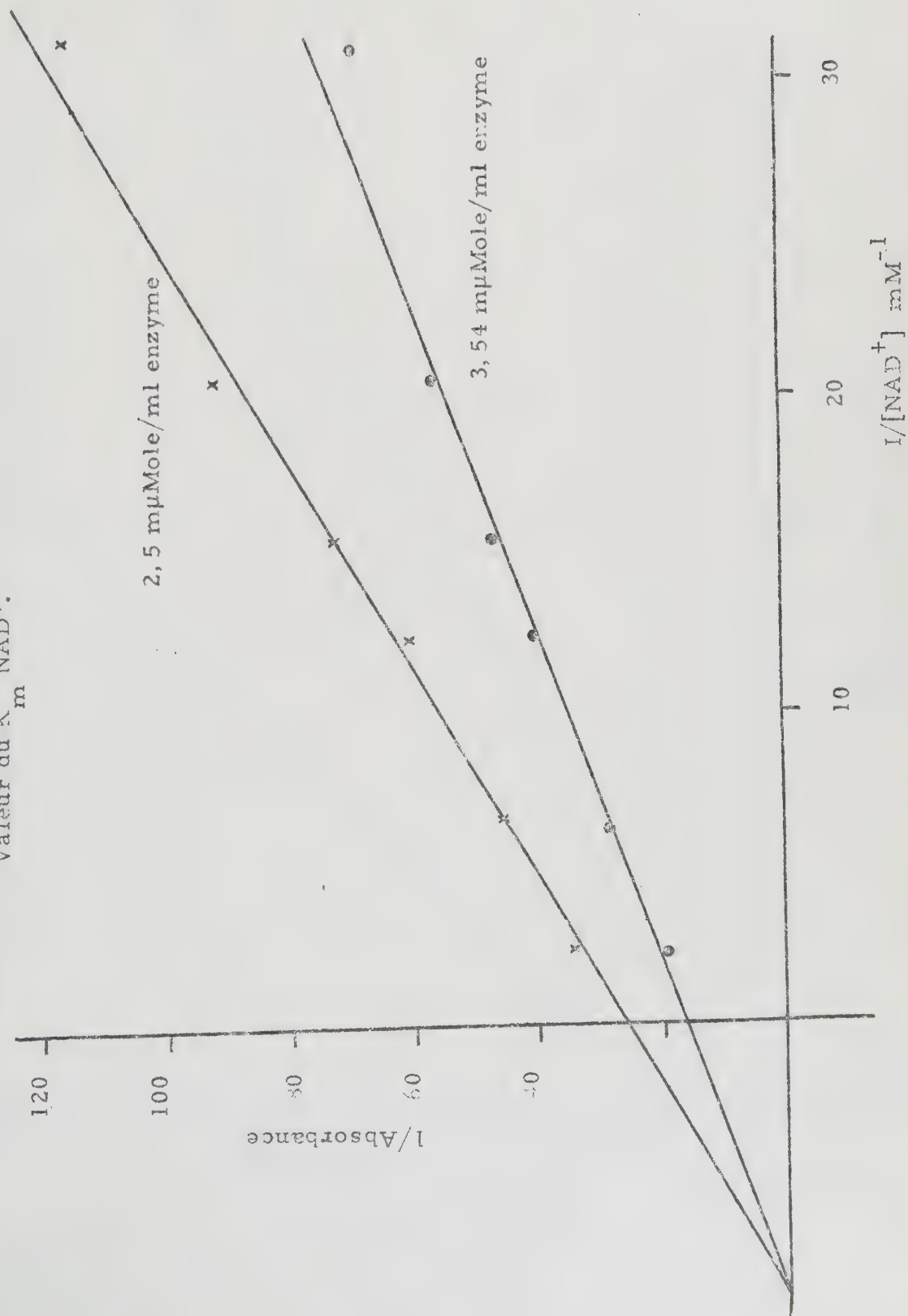


Figure 26 : Activité oxydante de la fraction oxydante.

Valeur de K_m D-glyceraldéhyde.

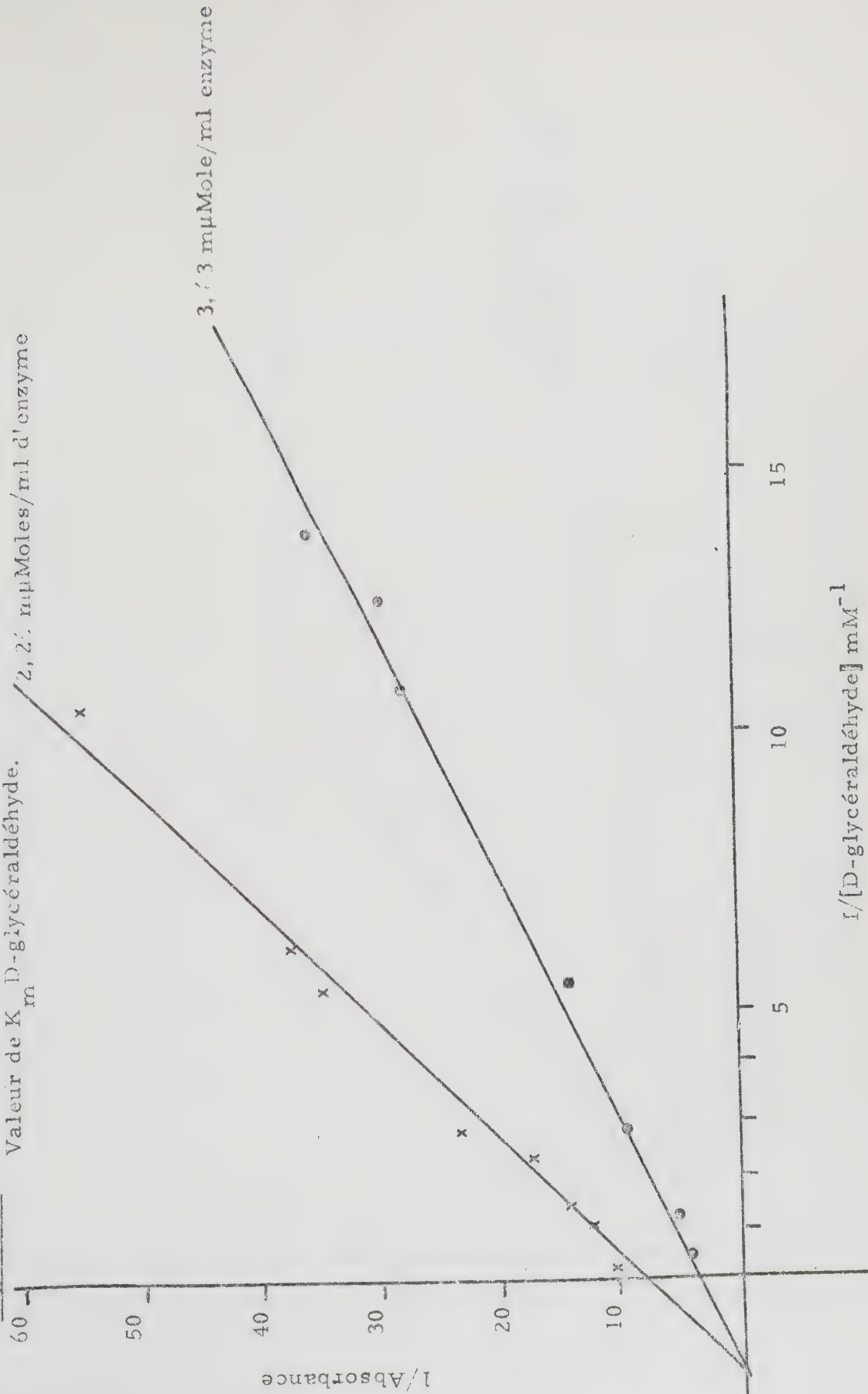


Figure 27 : Inhibition de l'activité oxydante par l'AMP 5'.

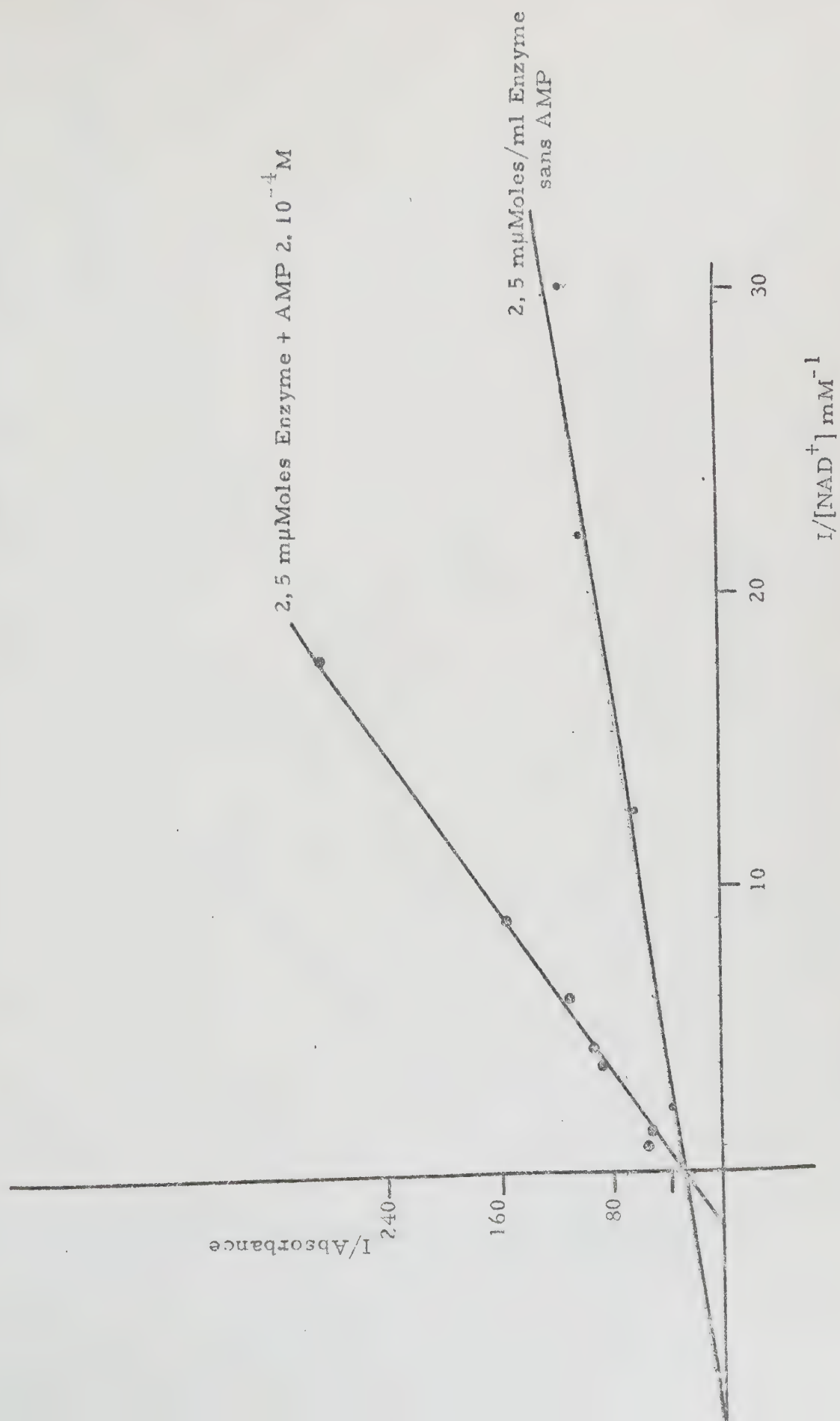


Figure 28: Activité estérasiqne de la fraction oxydante.

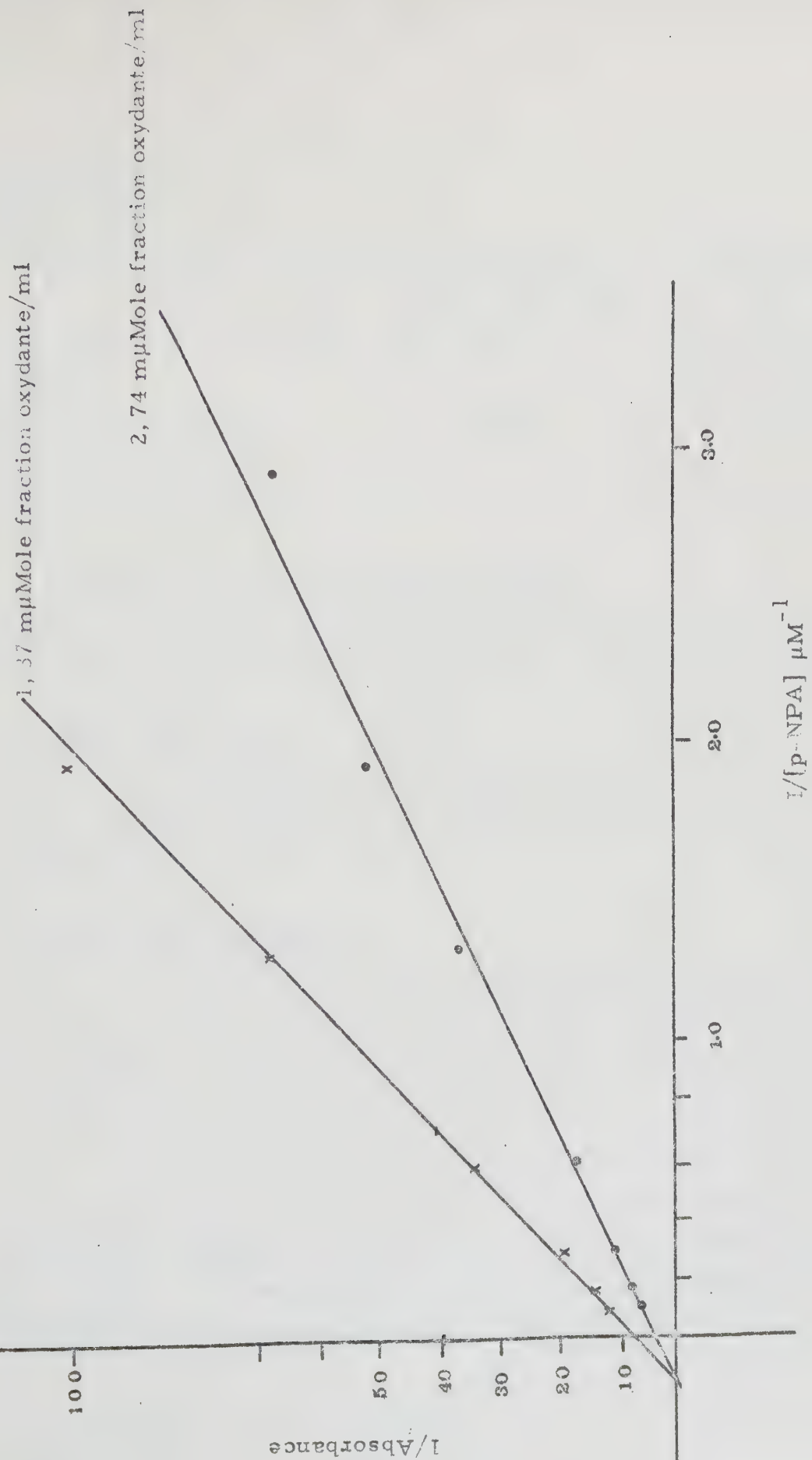


Tableau XII

	Fraction oxydante	GPDH (122)
$K_m \text{ NAD}^+$	$120 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$20 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
$K_m \text{ D-glycéraldéhyde}$	$61 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$1,1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

b/ Effet de l'AMP sur l'activité oxydante.

L'AMP inhibe l'activité oxydante. L'inhibition observée est de type compétitif, vis à vis du NAD^+ sa valeur est égale à $2,1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ (figure 27).

2) Activité estérasique.

La vitesse initiale de la réaction par mole d'enzyme n'a pas varié (figure 28). En revanche le K_m de la réaction est passé de $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ à $0,63 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

3) Activité phosphatasique.

De nombreux auteurs ont montré que l'activité acyl-phosphatasique n'existe que si les groupements sulfhydriles des cystéines actives de la GPDH sont oxydés par l'acide iodosobenzoïque. Avant de mesurer cette activité il est donc nécessaire de traiter la fraction oxydante de la même manière.

La fraction oxydante, traitée par 5 équivalents d'I. O. B. par mole pendant 20 minutes à 20° est inactivée à 91 % ; simultanément les huit groupements sulfhydriles présents dans la fraction oxydante (Tableau XIII) sont oxydés, et ne sont plus dosés par le DTNB. L'activité peut être recouvrée en faisant agir le 2-mercaptoéthanol ($0,03 \text{ M}$) pendant 60 minutes.

Tableau XIII : Inactivation réversible de la fraction oxydante par l'acide iodosobenzoïque.

% Activité oxydante			
	Activité initiale	Activité résiduelle après I. O. B.	Activité de l'enzyme réactivé
Enzyme natif	100	0	84
Fraction oxydante	100	9	74

La réversibilité de l'inactivation démontre que la modification n'a pas entraîné la dénaturation ; on peut donc étudier l'activité phosphatasique de la fraction oxydante et la comparer à celle de l'enzyme natif, traité de la même façon (tableau XIV). L'activité est mesurée selon la méthode de Ehring et Colowick ; la fraction oxydante ne manifeste aucune activité phosphatasique.

Tableau XIV : Activité phosphatasique de la fraction oxydante.

	Concentration en enzyme	Activité
	µg/ml	µg P _i libéré/mn
Enzyme natif traité par IOB	130	1,3
Fraction oxydante traitée par	156	0
IOB	312	0,05
	390	0,08

4) Activité NADH-X.

L'activité NADH-X a lieu dans un tampon pyrophosphate, pH 7,0. Au cours de la dialyse de la fraction oxydante contre ce tampon, l'activité oxydante persiste. Le tableau XV montre que contrairement à l'enzyme natif la fraction oxydante ne possède pas d'activité NADH-X.

Tableau XV : Activité NADH-X de la fraction oxydante

	Concentration en enzyme µg/ml	Activité NADH-X - DC/30 mn
Enzyme natif	30	0,036
	150	0,165
Fraction oxydante	100	0,00
	125	0,00
	300	0,00

C - Propriétés physico-chimiques.

1) Emission de fluorescence.

- Déplacement du maximum d'émission (figure 29) : Pour une longueur d'onde d'excitation de 290 nm, la fraction oxydante a un spectre d'émission de maximum égal à 350 nm au lieu de 335 nm dans l'enzyme natif. Ce déplacement bathochrome de 15 nm du maximum d'émission indique que le tryptophane est plus exposé au solvant dans la fraction oxydante que dans l'enzyme natif.

- Le NAD^+ provoque un quenching de fluorescence pour la fraction oxydante comme pour l'enzyme natif (figure 30). Le quenching maximum est atteint lorsque 3 NAD^+ par mole sont présents. On peut déduire de cet effet la constante de dissociation $K_D \text{NAD}^+ = 0,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ pour la fraction oxydante.

Figure 29 : Spectre d'émission de fluorescence de la fraction oxydante pour une excitation à 290 nm.

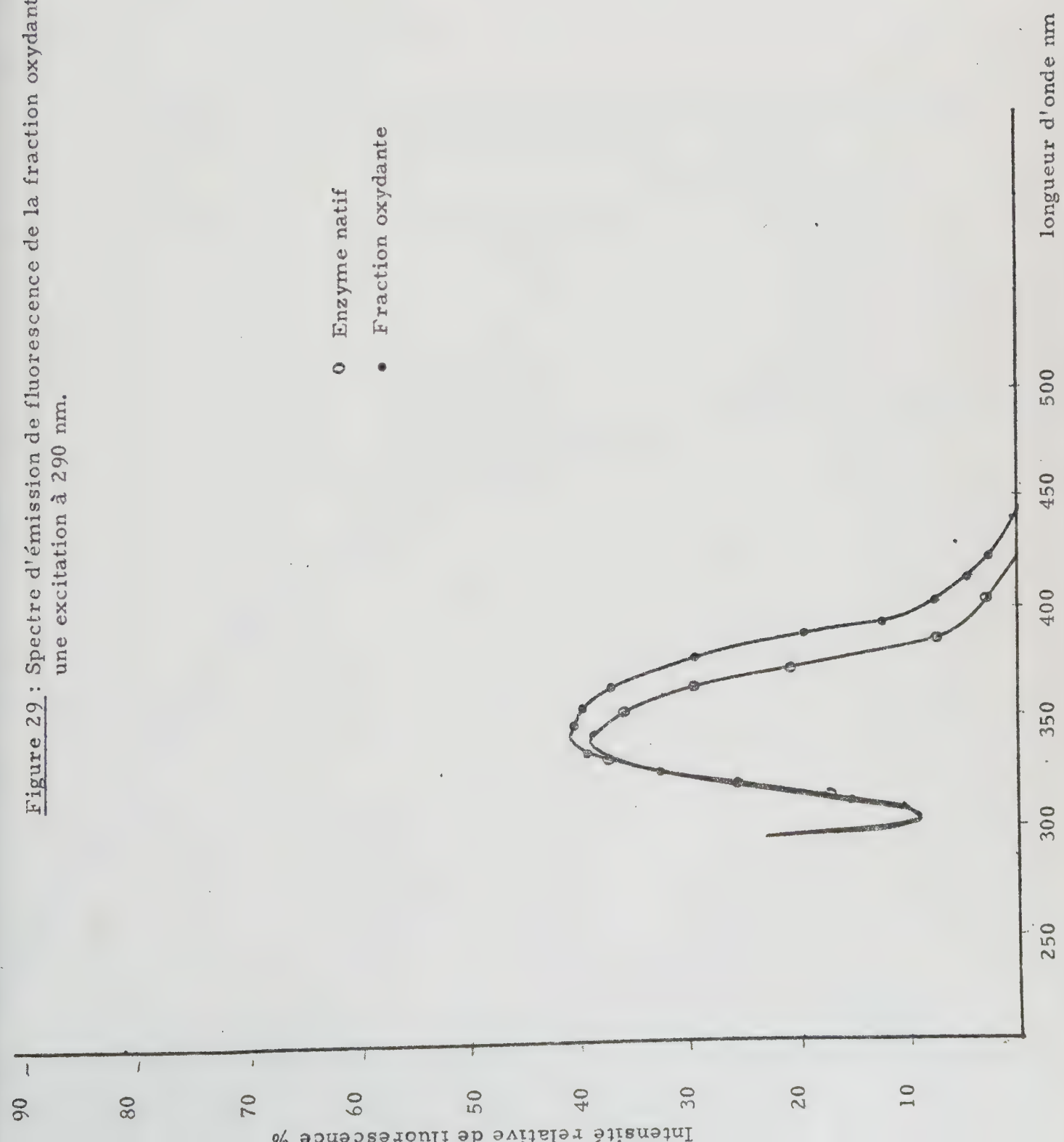
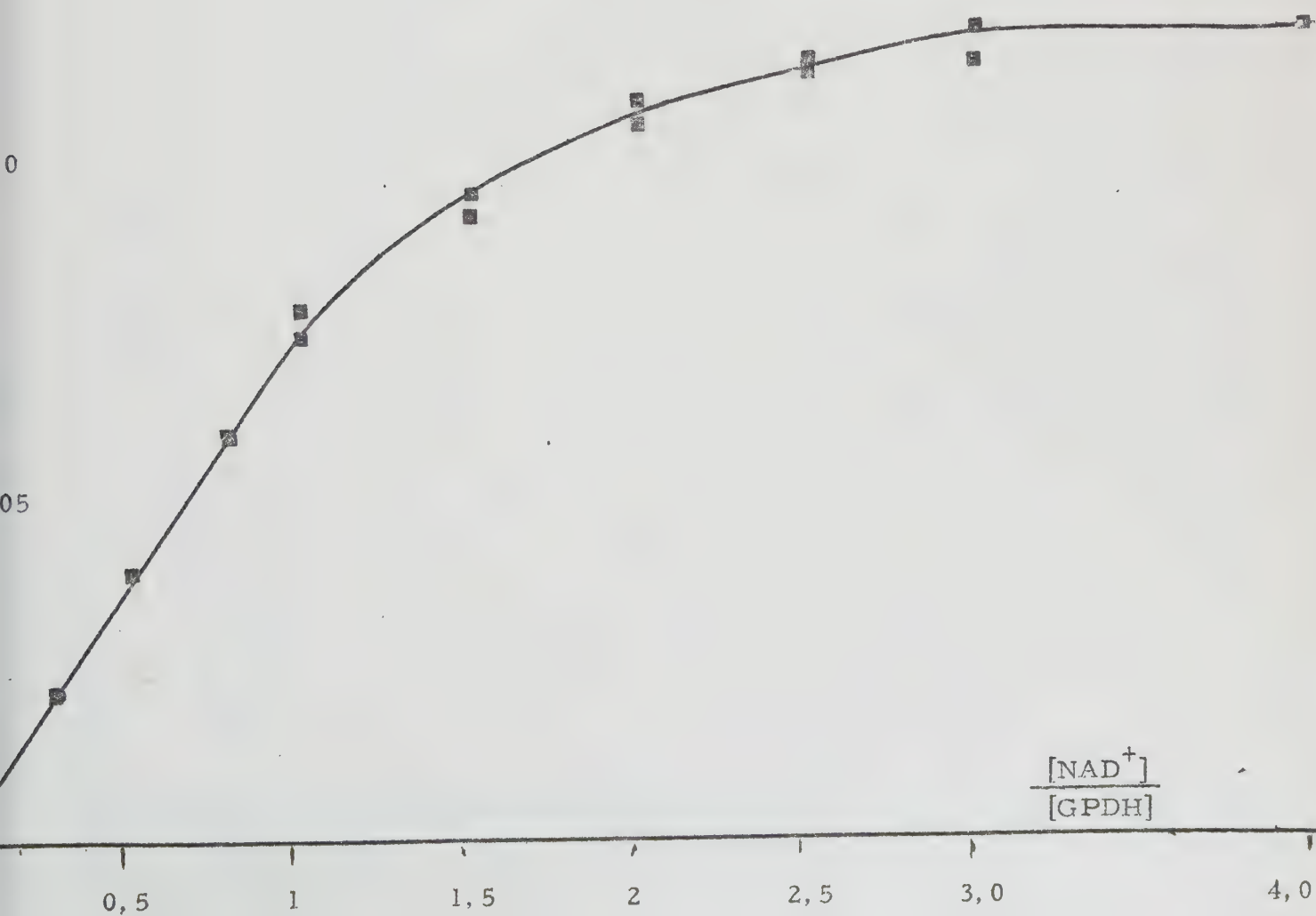


Figure 30 : Influence du NAD^+ sur l'émission de fluorescence du pic B.

F_o = émission de fluorescence à 350 nm pour l'apoenzyme.

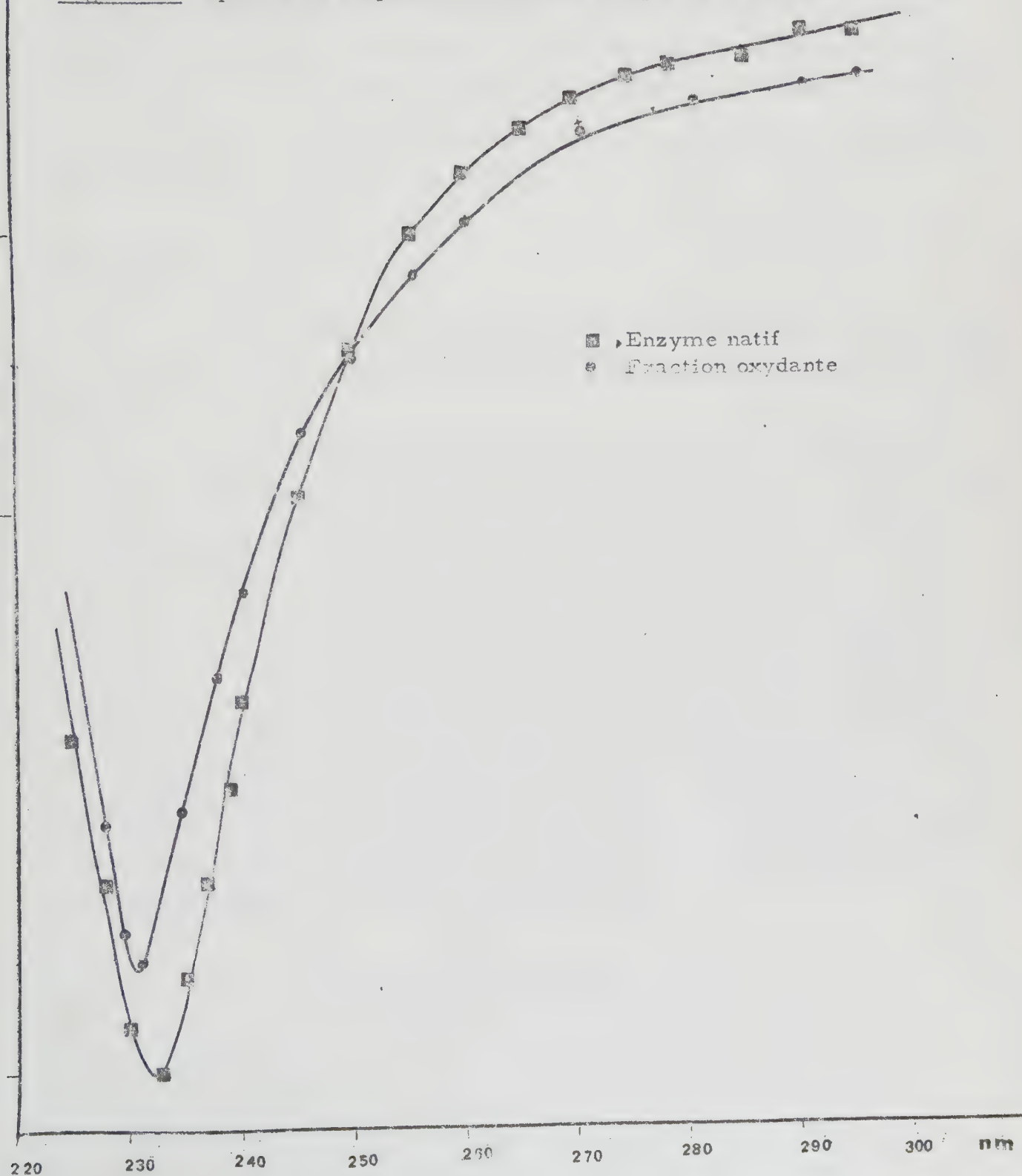
$F =$ " " " " pour l'apoenzyme + NAD^+ .

Concentration : 60 μg fraction oxydante/ml



$(M') \times 10^2$

Figure 31 : Spectre de dispersion rotatoire optique de la fraction oxydante.



2) Dispersion rotatoire.

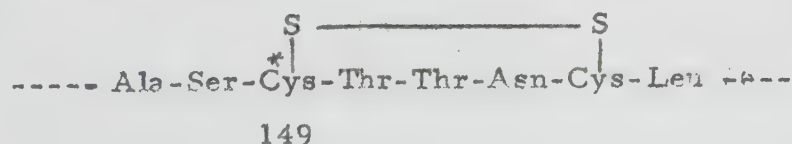
- Le NAD^+ ne provoque plus de changement dans le spectre de dispersion rotatoire optique : les deux courbes sont confondues : on n'observe plus l'effet Cotton mis en évidence dans la GPDH dans la zone 270 - 300 nm (figure 15).
- L'effet Cotton intrinsèque dans la zone 233 nm est légèrement déplacé vers les faibles longueurs d'ondes (figure 31).

Discussion

Tous ces résultats montrent qu'une protéolyse ménagée de la GPDH par la chymotrypsine entraîne la formation d'une fraction de haut poids moléculaire.

L'intérêt essentiel de son étude est la comparaison entre ses propriétés et celles de l'enzyme natif. Les points de similitude les plus importants concernent les propriétés catalytiques, l'interaction NAD^+ -enzyme et le nombre de sites actifs présents dans la fraction oxydante.

Au centre actif de la GPDH, deux cystéines sont très proches (tableau II) ; les deux autres au contraire sont situées aux extrémités de chaque sous-unité. Huit cystéines sont présentes dans la fraction oxydante et sont toutes oxydées sous l'action de l'acide o-iodosobenzoïque, alors que huit sur les seize peuvent être touchées dans la GPDH. Dans les deux cas, la modification chimique entraîne une inactivation réversible de l'activité oxydante. Ces résultats sont en faveur de la formation de quatre ponts disulfure entre les cystéines 149 et 153 de chaque protomère :



et vont dans le sens des données de Olson et Park (55). Ils permettent de prévoir que les quatre sites actifs présents dans une mole de GPDH le sont encore dans la fraction oxydante. L'action du NAD^+ sur l'émission de fluorescence à 350 nm de la fraction oxydante confirme ce résultat : l'effet de quenching maximum est observé lorsque 3 à 4 NAD^+ par mole sont présents.

Dans la fraction oxydante on ne dose plus que quatre tryptophanes par mole, soit un par centre actif ; ce résidu est sans doute impliqué dans le quenching observé aussi bien dans la GPDH que dans la fraction oxydante ; on ne peut cependant toujours pas préciser si cet effet est dû à un changement de l'environnement des tryptophanes lorsque le NAD^+ est lié à l'enzyme, ou à une interaction directe entre l'acide aminé et le coenzyme.

Toutefois certaines propriétés caractéristiques de l'interaction NAD^+ -GPDH ont disparu dans la fraction oxydante ; le coenzyme ne reste plus lié à l'enzyme lors d'un passage sur colonne de séphadex ; il ne semble plus capable de faire apparaître un changement de structure important dans la fraction oxydante (dispersion rotatoire optique). Peut-être la dispersion rotatoire ne permet-elle pas de déceler de faibles changements de conformation mis en évidence par émission de fluorescence. La constante de Michaelis pour le NAD^+ est passée de $20 \cdot 10^{-6}$ M à $120 \cdot 10^{-6}$ M dans la fraction oxydante. La constante d'inhibition de l'activité oxydante par l'AMP est toujours élevée ($2,1 \cdot 10^{-3}$ M), mais le type d'inhibition vis à vis du NAD^+ est modifié ; mixte dans l'enzyme natif, il devient compétitif dans la fraction oxydante. La persistance de l'inhibition par l'AMP met en évidence l'importance de l'adénosine, qui semble être un site de fixation du NAD^+ sur la GPDH ; c'est d'ailleurs un fait assez général dans les deshydrogénases (118, 119, 120).

Dans la fraction oxydante et dans la GPDH native le quenching de l'émission de fluorescence permet de titrer trois moles de NAD^+ sur les quatre qui peuvent interagir avec l'enzyme. D'autre part dans les deux cas, on observe une différence importante entre les valeurs des constantes de dissociation déduites de l'effet de quenching et celles qui sont obtenues pour les constantes de Michaelis (Tableau XVI).

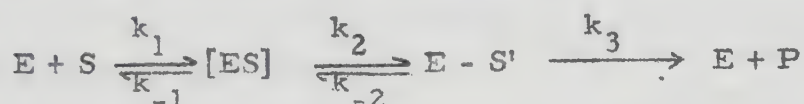
Tableau XVI

	GPDH	Fraction oxydante
K_D	$0,6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$0,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
K_m	$20 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$120 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

Dans l'enzyme natif, on a montré que la réaction catalytique fait intervenir presque uniquement une sous-unité et un NAD^+ sur les quatre. Selon Conway et Koshland (30), c'est la molécule de coenzyme la moins fortement liée à l'enzyme qui doit jouer une part prépondérante ; le K_D mesuré pour le 4ème NAD^+ lié a effectivement une valeur comprise entre 26 et $35 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, soit une valeur très proche de celle du K_m . Pour interpréter nos résultats dans le cas de la fraction oxydante, peut-être est-il possible de faire appel à la même explication.

L'oxydation phosphorylante est profondément modifiée dans la fraction oxydante. Le phosphate et l'arsenate ne sont plus des accepteurs d'acyle spécifiques, et seule l'activité oxydante a persisté ; toutefois elle est différente de celle de l'enzyme natif, car le NADH n'est plus inhibiteur de la réaction, et la désacylation n'est plus une étape limitante de l'activité.

La valeur du K_m du D-glycéraldéhyde est passée de $1,1 \cdot 10^{-6}$ à $61 \cdot 10^{-6}$ M. Si l'on représente l'activité oxydante par le schéma suivant :



si k_{-2} est négligeable, la valeur du K_m est $K_D \frac{k_3}{(k_2 + k_3)}$. Elle va

dépendre essentiellement des étapes susceptibles de limiter la réaction, l'acylation et la désacylation. Dans le cas de la fraction oxydante, on n'observe qu'une seule vitesse de réaction (figure 32).

En revanche dans le cas de la GPDH native la réaction se déroule en deux étapes, une première étape rapide; puis un état stationnaire s'établit. Quelle est la signification cinétique de ces deux étapes ? Jencks (121) envisage trois possibilités pour expliquer de telles cinétiques :

- a/ L'inhibition par l'un des produits de la réaction (Complexe E - P inhibiteur),
- b/ Une inactivation de l'enzyme au cours de la formation du complexe enzyme-substrat,
- c/ la formation au cours des étapes intermédiaires d'un complexe stable, qui inhibe la réaction.

Seule la dernière possibilité est compatible avec la mesure des vitesses d'acylation et de désacylation.

Examinons ces trois possibilités dans le cas de la GPDH :

a/ le NADH et le thioglycérol sont les produits de la réaction. Le NADH n'est jamais en concentration suffisante pour empêcher le NAD^+ de le déplacer (48).

Nous n'avons pas examiné l'action éventuelle du glycéryl-thioglycérol.

b/ Le NAD^+ bien loin d'inactiver l'enzyme donne à celui-ci sa conformation active. Le D-glycéraldéhyde possède un K_m de 10^{-6} M, son K_D est sans doute de l'ordre de 10^{-4} M.

c/ Smith a montré qu'il se forme effectivement un complexe ternaire

intermédiaire $\begin{array}{c} \text{NADH} \\ \diagup \\ \text{E} \\ \diagdown \\ \text{Acyl} \end{array}$ très stable au cours de la réaction (48). Il

intervient entre l'acylation et la désacylation et permet d'expliquer que la vitesse de désacylation soit limitante. C'est cette dernière explication qui est la plus généralement admise.

L'analyse cinétique des courbes obtenues pour l'activité oxydante de l'enzyme natif permet donc la détermination des vitesses d'acylation et de désacylation. La formation de NADH en fonction du temps (figure 32) obéit à une relation du type $P = At + B(1 - e^{-bt})$: Bender et al. (122) en supposant que la concentration en substrat est très élevée par rapport au K_m définissent les paramètres A et B par les relations

$$A = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} [E]_0$$

$$B = [E]_0 \left[\frac{k_2}{k_2 + k_3} \right]^2$$

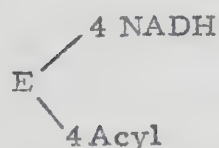
$$[E]_0 = [E] + [ES] + [ES']$$

Le tableau XVI donne les valeurs obtenues pour l'enzyme natif et la fraction oxydante.

Tableau XVI

	Activité oxydante			Activité phosphorylante	
	$k_2 \text{ min}^{-1}$	$k_3 \text{ min}^{-1}$	E_o		
enzyme	$0.592 \pm 0,050$	$0,068 \pm 0,01$	$3,6 \pm 0,3$	$0,693 \text{ min}^{-1}$	$\pm 0,030$
fraction oxydante	$0.252 \pm 0,050$			0	

- Dans l'enzyme natif la valeur de $[E]_0$ est sensiblement égale à $3,6 \pm 0,3$ sites par mole de GPDH ce qui indique que lorsque l'état stationnaire est établi, la GPDH est sous la forme :



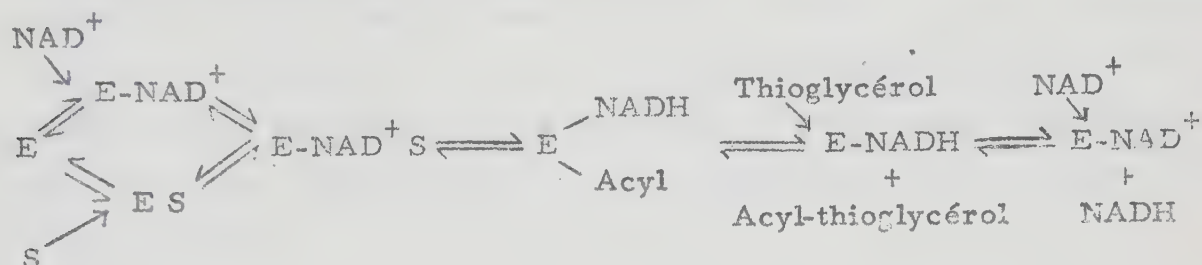
; la décomposition de ce complexe est donc bien l'étape

limitante de l'activité oxydante pour l'enzyme natif. Les valeurs déterminées pour k_2 dans l'activité oxydante et dans l'activité phosphorylante sont respectivement $0,592$ et $0,693 \text{ min}^{-1}$.

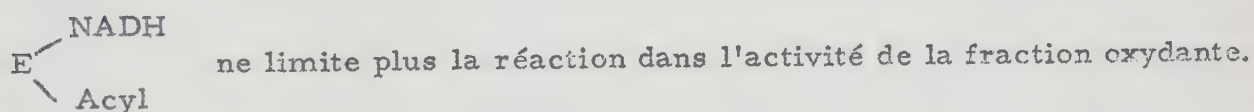
Ce résultat est en faveur des données de Keleti et al. (123) selon lesquelles la fixation du phosphate se ferait seulement après l'étape d'acylation.

- Dans la fraction oxydante, la vitesse d'acylation est de $0,252 \text{ min}^{-1}$; elle a diminué sensiblement d'un facteur 2. k_3 serait plus grand ou égal à $0,252 \text{ min}^{-1}$ en admettant que k_2 est l'étape limitante de la réaction ; dans l'enzyme natif sa valeur est égale à $0,068 \text{ min}^{-1}$. Ainsi les variations de k_2 et k_3 contribuent à augmenter la valeur du K_m D-glycéraldéhyde.

Si l'on représente les étapes intermédiaires de l'activité oxydante de l'enzyme natif et de la fraction oxydante :



la différence essentielle est que la décomposition du complexe ternaire



L'activité estérasique persiste dans la fraction oxydante mais le K_m y est plus élevé que dans l'enzyme natif. Le K_m a varié dans le même sens que celui de l'activité oxydante.

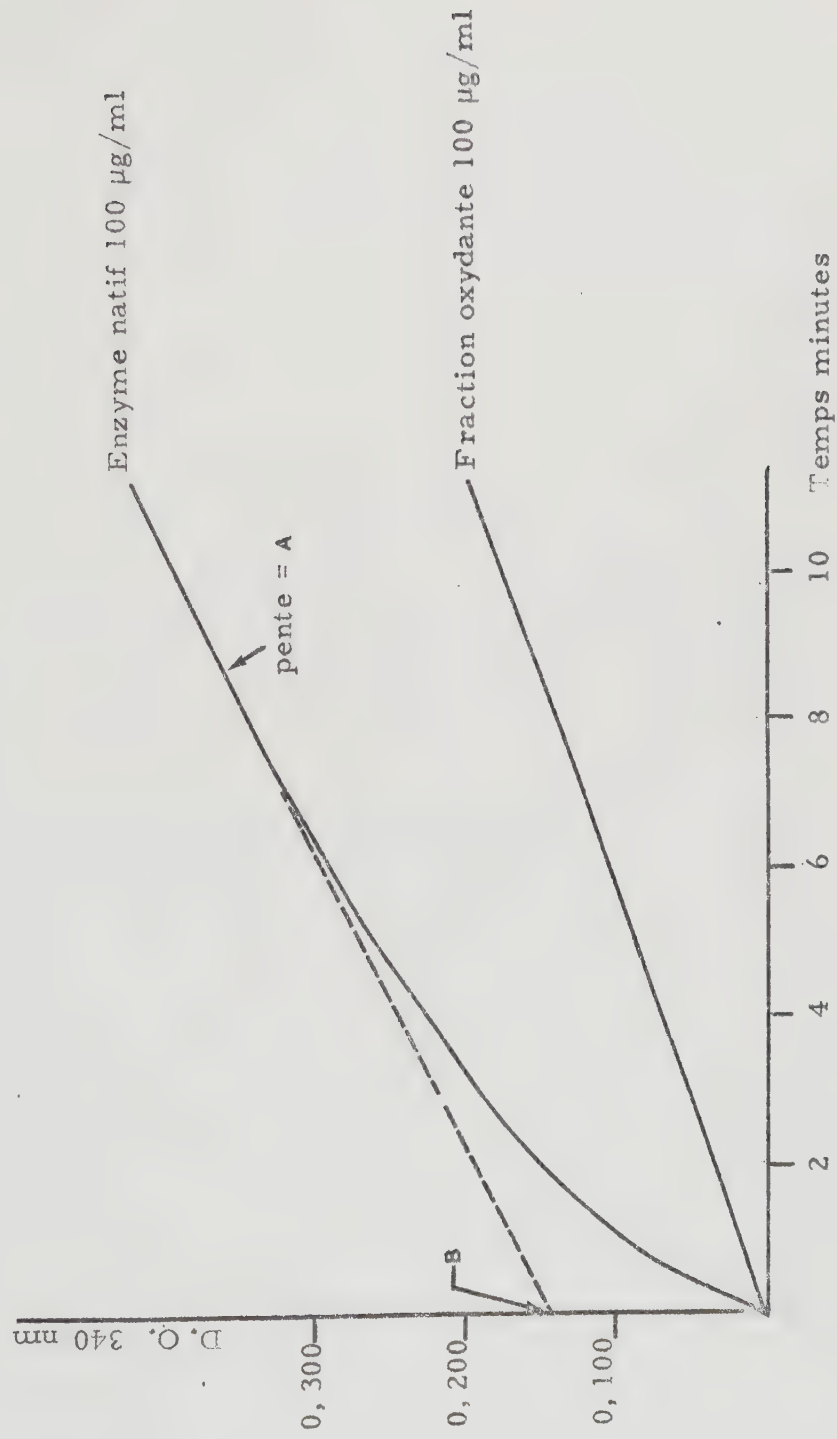
L'activité phosphatasique n'est plus présente dans la fraction oxydante purifiée. Certains auteurs ont montré que son existence est reliée à la présence du site de phosphorylation ; dans la fraction oxydante, on observe simultanément la disparition des activités phosphorylante et phosphatasique.

L'activité NADH-X a également disparu ; Selon Hilvers et al. (69) le site de phosphorylation est nécessaire à cette activité. Nos résultats vont dans le même sens que leur hypothèse. Toutefois, on peut également attribuer la disparition de l'activité NADH-X à la diminution de l'affinité NADH-enzyme ou au fait que la présence de cette activité nécessite dans la GPDH native la conformation de l'holoenzyme assurée par la présence de 2 NAD^+ par mole.

Figur : 32 : Activité oxydante de l'enzyme natif et de la fraction oxydante.

$$A = \frac{k_2 k_3}{(k_2 + k_3)} [E]_0, \quad B = [E]_0 \left[\frac{k_2}{(k_2 + k_3)} \right]^2$$

La différence entre la pente au début de la réaction et la pente finale permet d'obtenir la valeur $(k_2 + k_3)$.



CHAPITRE III : CONCLUSION

Ce travail nous a permis :

- 1) de montrer le comportement de la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase lorsqu'elle subit l'action de la chymotrypsine et l'influence de différents ligands sur sa protéolyse,
- 2) de déterminer les conditions les plus favorables à l'obtention d'une fraction oxydante,
- 3) d'étudier les propriétés fondamentales de cette fraction.

Trois ligands manifestent une influence sur la protéolyse de la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase, le glycéraldéhyde-3-phosphate, le NAD^+ et l'AMP.

- Le glycéraldéhyde-3-phosphate qui protège l'enzyme est donc susceptible de se lier à l'enzyme sous forme de complexe binaire, en absence de coenzyme, et cette interaction provoque un changement de conformation donnant une structure compacte à l'enzyme.

- Le NAD^+ assure une protection complète de la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase lorsque 2 équivalents du coenzyme sont liés à une mole d'enzyme. Ces données vont dans le sens de l'hypothèse émise par Conway et Koshland selon laquelle le maintien de la conformation dans l'enzyme de lapin est assuré uniquement par les deux premiers NAD^+ fixés, tandis que les deux derniers dont la constante de dissociation est beaucoup moins élevée, participent pour la plus grande part à la réaction catalytique.

- L'AMP en revanche sensibilise la deshydrogénase à l'égard de l'action de la chymotrypsine ; la constante apparente de dissociation AMP-enzyme est de

$K_{AMP} = 1,2 \cdot 10^{-4}$ M. L'activité arsenylante disparaît rapidement, tandis que les activités oxydante et estérasique sont maintenues. Son site de fixation est sans doute celui du noyau adénylique, puisque l'AMP peut déplacer le coenzyme et lever la protection apportée par deux équivalents de NAD^+ .

La méthode protéolytique nous a permis de mettre en évidence de faibles changements de conformation de la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase provoqués par divers effecteurs, et de déterminer des constantes de dissociation effecteurs-enzyme.

A partir de ces résultats concernant la protéolyse de la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase on peut conclure que :

- 1) tous les ligands capables de modifier la structure de l'enzyme modifient son comportement vis à vis de la protéolyse chymotrypsique,
- 2) la protéolyse dissocie séquentiellement trois activités importantes :
a/ phosphorylante, b/ oxydante, c/estérasique.

La présence d'AMP stabilise la fraction oxydante ; cela nous a permis d'améliorer considérablement le rendement en cette fraction à la suite d'une purification sur colonne de Séphadex G 100 et d'en étudier les propriétés essentielles.

Cette stabilisation montre que l'AMP doit interagir avec la fraction oxydante et la protéger au cours de la protéolyse.

L'activité estérasique est la fonction la plus simple que réalise la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase ; elle ne fait intervenir vraisemblablement qu'une attaque de la forme anionique d'un groupement sulfhydryle d'une cystéine active par sous-unité sur une liaison ester. C'est également l'activité la plus stable au cours de la dégradation par la chymotrypsine.

Les deux fonctions qui font sans doute intervenir le site de phosphorylation sont les activités phosphatasique et NADH-X ; elles ne sont plus

présentes dans la fraction oxydante. Par filtration sur gel de Séphadex G 100, on peut estimer son poids moléculaire à 65.000 ± 5.000 ; le coefficient de sédimentation du pic ainsi isolé est de $S_{20}^W = 4,4 \pm 0,2$. L'analyse des acides aminés de cette fraction met en évidence en particulier la présence de huit cystéines et de quatre tryptophanes. Le centre actif de chaque sous-unité comporte deux cystéines distantes seulement de quatre résidus qui ne sont pas susceptibles d'être touchés par la protéolyse chymotrypsique. D'autre part l'oxydation par l'iodosobenzoate entraîne la disparition de tous les groupements sulfhydriles réduits et inactive l'enzyme. La réversibilité de cette réaction plaide en faveur de la formation de quatre ponts disulfures intramoléculaires et de l'existence de quatre centres actifs par mole de fraction oxydante.

L'effet du NAD^+ sur son émission de fluorescence confirme ce résultat : le quenching de la fluorescence atteint sa valeur maximale lorsque quatre équivalents de coenzyme interagissent avec la fraction oxydante ; les résidus tryptophanes (un par sous-unité) devraient être responsables de cet effet dans la fraction oxydante et dans l'enzyme natif. Cependant le NAD^+ ne provoque sans doute plus de changement important dans la conformation de l'enzyme, car il ne fait plus apparaître d'effet Cotton extrinsèque entre 270 et 300 nm.

Ainsi l'analyse des propriétés de la fraction oxydante permet de montrer quelles sont les activités liées à la présence du site de phosphorylation (NADH-X et phosphatasique), celle qui n'exige que l'interaction entre le NAD^+ et le centre catalytique pour réaliser une réaction de transacylation (activité oxydante) ; celle enfin qui ne nécessite que la présence de la cystéine du centre actif (activité estérasique).

Cette étude nous ouvre encore actuellement beaucoup de perspectives.

- L'analyse de la structure de la fraction oxydante, reliée à ses propriétés catalytiques et physico-chimiques pourrait en particulier nous permettre de déterminer 1) quel est le tryptophane responsable du phénomène de quenching d'émission de fluorescence lorsque le NAD^+ interagit avec la GPDH, 2) si la lysine 181 est toujours présente dans la fraction oxydante, et si elle est encore réactive.

- L'étude de l'influence de différents ligands (AMP cyclique 3'5', NMN, 2-aniline naphthalène-8-sulfonate (ANS)) sur les propriétés de cette fraction pourrait permettre de préciser la nature de l'interaction NAD^+ enzyme et de voir si cette interaction entraîne encore des changements décelables dans la conformation de l'enzyme.

Il serait intéressant de déterminer les constantes de dissociation pour chaque NAD^+ lié à la fraction oxydante, car les résultats obtenus pour le K_m et le K_D déduit du phénomène de quenching de l'émission de fluorescence nous amènent à envisager la possibilité d'un phénomène de coopérativité négative en ce qui concerne l'interaction fraction oxydante - NAD^+ .

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - Hess dans "Control of Energy metabolism", édité par B. Chance,
R. W. Estabrook et J. R. Williamson, (1965) p. 143.
- 2 - W. F. Harrington et G. M. Karr,
J. Mol. Biol., 13 (1965) 885.
- 3 - B. E. Davidson, M. Sajgo, H. F. Noller et J. I. Harris,
Nature, 216 (1967) 23.
- 4 - J. I. Harris in Advanced study Institute on Pyridine nucleotide-
Dehydrogenases, Constance (Allemagne) Septembre 1969.
- 5 - W. S. Allison et N. O. Kaplan,
J. Biol. Chem., 239 (1964) 2140.
- 6 - H. C. Watson et L. J. Banaszack,
Nature, 204 (1964) 918.
- 7 - O. P. Chilson, G. B. Kitto, J. Pudles et N. O. Kaplan,
J. Biol. Chem., 241 (1966) 2431.
- 8 - O. J. Koepe, P. D. Boyer et M. P. Stulberg,
J. Biol. Chem., 219 (1956) 569.
- 9 - S. F. Velick et J. E. Hayes,
J. Biol. Chem., 203 (1953) 545.
- 10 - E. Racker,
Physiol. Rev., 35 (1955) 1.
- 11 - E. Racker et I. Krimsky,
Science, 122 (1955) 319.
- 12 - I. Krimsky et E. Racker,
Biochemistry, 2 (1963) 512.
- 13 - O. J. Koepe, P. D. Boyer et D. S. Sheppard,
Federation Proc., 18 (1959) 263.
- 14 - A. L. Murdoch et O. J. Koepe,
J. Biol. Chem., 239 (1964) 1983.

- 15 - L. Rapkine,
Biochem. J., 32 (1938) 1729.
- 16 - I. Krimsky et E. Racker,
Federation Proc., 14 (1955) 239.
- 17 - I. Krimsky et E. Racker,
Federation Proc., 17 (1958) 1135.
- 18 - W. S. Allison et J. I. Harris,
Second FEBS Meeting, Vienne, 1965, A205, 140.
- 19 - W. S. Allison,
Annals of the New York Academy of Science, vol. 151 (1958) 180.
- 20 - E. Racker et I. Krimsky,
Nature, 169 (1952) 1043.
- 21 - B. Chance et J. H. Park,
J. Biol. Chem., 242 (1967) 5093.
- 22 - K. Kirschner, M. Eigen, R. Bittman et B. Voigt,
Proc. Natl. Acad. Sci., U. S., 56 (1966) 1661.
- 23 - J. J. M. de Vijlder et E. C. Slater,
Biochim. Biophys. Acta, 167 (1968) 23.
- 24 - J. J. M. de Vijlder, W. C. Boers et E. C. Slater,
Biochim. Biophys. Acta, 191 (1969) 214.
- 25 - S. F. Velick,
J. Biol. Chem., 233 (1958) 1455.
- 26 - T. Keleti,
Biochem. Biophys. Res. Comm., 30 (1968) 185.
- 27 - I. Listowski, C. S. Furfine, J. J. Betheil et S. England,
J. Biol. Chem., 240 (1965) 4253.
- 28 - I. A. Bolotina, D. S. Markovich, M. V. Volkenstein et P. Zavodsky,
Biochim. Biophys. Acta, 132 (1967) 260.

- 29 - R. Jaenicke et W.B. Gratzner,
European J. Biochem., 10 (1968) 158.
- 30 - A. Conway et D.E. Koshland,
Biochemistry, 7 (1968) 4011.
- 31 - D.E. Koshland et R.A. Cook,
"Advances study institute on pyridine nucleotide dependent dehydrogenas.
Constance (1969).
- 32 - S.F. Velick,
J. Biol. Chem., 203 (1953) 563.
- 33 - A. Stockell,
J. Biol. Chem., 234 (1959) 1286.
- 34 - B. Chance et J. Harting,
Fed. Proc., 12 (1953) 188.
- 35 - J. Harting et B. Chance,
Fed. Proc., 12 (1953) 714.
- 36 - B. Chance dans W.D. Mc Elroy et B. Glass (Editeurs) "Mechanism of
enzyme action", Johns Hopkins Press, Baltimore, 1954, p. 399.
- 37 - E. Racker, et I. Krimsky,
J. Biol. Chem., 198 (1952) 731.
- 38 - E.M. Kosower,
J. Am. Chem. Soc., 78 (1956) 3497.
- 39 - E.M. Kosower, dans "Flavins and Flavoproteins"(EBA Library, vol. 8),
édité par E. C. Slater, Elsevier, Amsterdam, 1966, p. 1.
- 40 - G. Stancel et W.C. Deal Jr.,
Biochem. Biophys. Res. Comm., 31 (1968) 398.
- 41 - Shih Tzy Yang et W.C. Deal Jr.,
Biochemistry, 8 (1969) 2806.
- 42 - Shih Tzy Yang et W.C. Deal Jr.,
Biochemistry, 8 (1969) 2814.
- 43 - S.M. Constantidinès et W.C. Deal Jr.,
J. Biol. Chem., 244 (1969) 5695.

- 44 - N.K. Nagradova, M.K. Vorona et P.A. Asrijanz,
Biokhymia, 34 (1969) 627.
- 45 - M. Sapag-Hagar,
Revista Espagnola de Fisiologia, 25 (1969) 201.
- 46 - L. Polgär,
Experientia, 22 (1966) 232.
- 47 - J. Harting et S.F. Velick,
Fed. Proc., 12 (1953) 714.
- 48 - T.E. Smith,
Biochemistry, 5 (1966) 2919.
- 49 - W.S. Allison, M.J. Connors et D.J. Parker,
Biochem. Biophys. Res. Comm., 34 (1969) 503.
- 50 - J.J.M. de Vijlder, A.G. Hilvers, J.M.J. Van Lis et E.C. Slater,
Biochim. Biophys. Acta, 191 (1969) 221.
- 51 - J. Teipel et D.E. Koshland Jr.,
Biochim. Biophys. Acta, 198 (1970) 183.
- 52 - J.H. Park, B.P. Meriwether, P. Clodfelder et L.W. Cunningham,
J. Biol. Chem., 236 (1961) 136.
- 53 - N.T.A. Behme et E.H. Cordes,
J. Biol. Chem., 242 (1967) 5500.
- 54 - R.N. Lindquist et E.H. Cordes,
J. Biol. Chem., 243 (1968) 5837.
- 55 - E.J. Olson et J.H. Park,
J. Biol. Chem., 239 (1964) 2316.
- 56 - E. Taylor, B.P. Meriwether et J.H. Park,
J. Biol. Chem., 238 (1963) 734.
- 57 - E. Mathew, B.P. Meriwether et J.H. Park,
J. Biol. Chem., 242 (1967) 5024.
- 58 - R.N. Perham et J.I. Harris,
J. Mol. Biol., 7 (1963) 316.

- 59 - A.H. Gold et H. L. Segal,
Biochemistry, 3 (1964) 778.
- 60 - B. S. Hartley et B. A. Kilby,
Biochem. J., 56 (1954) 288.
- 61 - S. Halcomb, J. S. Bond, R. Kloeper et J. H. Park,
Fed. Proc., 27 (1968) Abstract n°435, p. 292.
- 62 - J. S. Bond, S. H. Francis et J. Harting Park,
J. Biol. Chem., 215 (1970) 1041.
- 63 - J. Ovadi et T. Keleti,
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., 4(1969) 365.
- 64 - J. H. Park et D. E. Koshland Jr.,
J. Biol. Chem., 233 (1958) 986.
- 65 - R. Ehrling et P. Colowick,
J. Biol. Chem., 244 (1969) 4589.
- 66 - B. E. Davidson,
Eur. J. Biochem., 14 (1970) 545.
- 67 - F. Traoré,
Résultats non publiés (Thèse de 3e Cycle, Faculté des Sciences d'Orsay
Juillet 1970.
- 68 - G. W. Rafter, S. Chaykin et E. G. Krebs,
J. Biol. Chem., 208 (1954) 799.
- 69 - A. G. Hilvers, J. H. M. Weenen et K. Van Dam,
Biochim. Biophys. Acta, 128 (1966) 74.
- 70 - D. E. Griffith et R. A. Chaplain,
Biochem. Biophys. Res. Comm., 8 (1962) 501.
- 71 - J. A. Barltrop, P. W. Grubb et B. Hesp,
Nature, 199 (1963) 759.
- 72 - S. P. A. Alivisatos, F. Ungar, G. J. Abraham,
Biochemistry, 4 (1965) 2616.
- 73 - A. G. Anderson Jr et G. Berkelhammer,
J. Am. Chem. Soc., 80 (1958) 992.

- 74 - R. M. Burton et N. O. Kaplan,
Arch. Biochem. Biophys., 101 (1963) 150.
- 75 - T. Keleti et M. Telegdi,
Act. Physiol. Acad. Sci. Hung., 17 (1960) 141.
- 76 - G. W. Rafter et S. P. Colowick,
Arch. Biochem. Biophys., 66 (1957) 190.
- 77 - J. I. Harris et L. Polgär,
J. Mol. Biol., 14 (1965) 630.
- 78 - L. Polgär,
Biochim. Biophys. Acta, 118 (1966) 276.
- 79 - G. T. Cori, M. W. Slein et C. F. Cori,
J. Biol. Chem., 173 (1948) 605.
- 80 - C. Gros et B. Labouesse,
Eur. J. Biochem., 7 (1969) 463.
- 81 - J. F. Taylor, A. A. Green et G. T. Cori,
J. Biol. Chem., 173 (1948) 591.
- 82 - G. Beisenherz, T. Bücher et K. H. Garbade, dans S. P. Colowick et
N. O. Kaplan, "Methods in Enzymology", Vol. I, Academic Press,
New York, 1955, p. 391.
- 83 - J. B. Fox et W. B. Dandliker,
J. Biol. Chem., 221 (1956) 1005.
- 84 - F. Lipmann et L. C. Tuttle,
J. Biol. Chem., 159 (1945) 21.
- 85 - L. Berenblum et E. Chain,
Biochem. J., 32 (1938) 295.
- 86 - V. Henri,
Compt. Rendus Acad. Sci., Paris, 135 (1902) 916.
- 87 - L. Michaelis et M. L. Menten,
Biochem. Z., 49 (1913) 333.

- 88 - H. Lineweaver et O. Burk,
J. Am. Chem. Soc., 56 (1934) 658.
- 89 - G. L. Ellman,
Arch. Biochem. Biophys., 82 (1959) 70.
- 90 - P. H. W. Butterworth, H. Baum et S. W. Porter,
Arch. Biochem. Biophys., 118 (1967) 716.
- 91 - V. Meyer et W. Wachter,
Ber. 25 (1892) 2632.
- 92 - D. J. Parker et W. S. Allison,
J. Biol. Chem., 244 (1969) 180.
- 93 - G. W. Rafter,
Arch. Biochem. Biophys., 67 (1957) 267.
- 94 - S. Moore et W. Stein,
J. Biol. Chem., 211 (1954) 907.
- 95 - E. S. West et R. E. Rinehart,
J. Biol. Chem., 146 (1942) 105.
- 96 - A. F. S. A. Habeeb,
Anal. Biochem., 14 (1966) 328.
- 97 - T. Okuyama et K. Satake,
J. Biochem., 47 (1960) 454.
- 98 - K. Satake, T. Okuyama, M. Ohashi et T. Shinoda,
J. Biochem., 47 (1960) 654.
- 99 - A. Kotaki, M. Harada et K. Yagi,
J. Biochem. Tokyo, 55 (1964) 553.
- 100 - T. W. Goodwin et R. A. Morton,
Biochem. J., 40 (1946) 628.
- 101 - A. Patchornik, W. B. Lawson et B. Witkop,
J. Am. Chem. Soc., 80 (1958) 4747.

- 102 - A. Patchornik, W.B. Lawson, E. Gross et B. Witkop,
J. Am. Chem. Soc., 82 (1960) 5923.
- 103 - T. Viswanatha et W.B. Lawson,
Arch. Biochem. Biophys., 93 (1961) 130.
- 104 - T.F. Spande et B. Witkop, dans S.P. Colowick et N.O. Kaplan,
"Methods in Enzymology" édité par C.H.W. Hirs, Academic Press,
New York and London, Vol. XI, p. 498 (1967).
- 105 - T. Svedberg et K.O. Pedersen,
"The Ultracentrifuge" Oxford Un. Press, London and New York,
Johnson Reprint Corporation, New York.
- 106 - Magar E. Magar,
J. Biol. Chem., 242 (1967) 2517.
- 107 - N.S. Simmons, C. Cohen, A.G. Szent-Györgyi, D.B. Wetlaufer et
E.R. Blout,
J. Am. Chem. Soc., 83 (1961) 4766.
- 108 - W. Moffit et J.T. Yang,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 42 (1956) 596.
- 109 - I. Harris et R.W. Perham,
Abstracts Sixth International Congress of Biochem., 1964, I. U. B.,
Vol. 32, p. 293, IV, 527.
- 110 - G.D. Fasman, dans S.P. Colowick et N.O. Kaplan (Editeurs)
Methods in Enzymology, Vol. 6, Academic Press Inc., New York,
(1963), p. 928.
- 111 - E.R. Blout, J.P. Carver et E. Shechter, dans "Optical Rotatory
dispersion of polypeptides and proteins", G. Snatzke, Editeur,
publié par Heyden et Fils, Londres (1965) p. 224.
- 112 - G.T. Schwert et Y. Takenaka,
Biochim. Biophys. Acta, 159 (1955) 570.

- 113 - A. Fenselau,
Biochem. Biophys. Res. Comm., 40 (1970) 481.
- 114 - B. Cantau, C. Brunel et J. Pudles,
Biochim. Biophys. Acta, 167 (1968) 511.
- 115 - B. Cantau, G. Jaureguiberry et J. Pudles,
Eur. J. Biochem., 16 (1970) 208.
- 116 - G. Jacobs et L. W. Cunningham,
Biochemistry, 7 (1968) 143.
- 117 - R. C. Adelman, R. C. Morse, D. E. Chan W. et B. L. Horecker,
Arch. Biochem. Biophys., 126 (1968) 343.
- 118 - M. J. Adams, A. Mc. Pherson Jr., M. G. Rossmann, R. W. Schevitz et
A. J. Wonacott,
J. Mol. Biol., 51 (1970) 31.
- 119 - A. Mc. Pherson Jr.,
J. Mol. Biol., 51 (1970) 39.
- 120 - J. D. Shore,
Biochemistry, 8 (1969) 1588.
- 121 - M. L. Bender, F. J. Kezdy et F. C. Wadler,
J. of Chem. Education, 44 (1967) 84.
- 122 - L. A. Fahien,
J. Biol. Chem., 241 (1966) 4115.
- 123 - T. Keleti,
Advanced Study on Pyridine nucleotide-dependent dehydrogenases,
Constance, Septembre 1969, II - 9.

CHAPITRE III : CONCLUSION

Ce travail nous a permis :

- 1) de montrer le comportement de la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase lorsqu'elle subit l'action de la chymotrypsine et l'influence de différents ligands sur sa protéolyse,
- 2) de déterminer les conditions les plus favorables à l'obtention d'une fraction oxydante,
- 3) d'étudier les propriétés fondamentales de cette fraction.

Trois ligands manifestent une influence sur la protéolyse de la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase, le glycéraldéhyde-3-phosphate, le NAD^+ et l'AMP.

- Le glycéraldéhyde-3-phosphate qui protège l'enzyme est donc susceptible de se lier à l'enzyme sous forme de complexe binaire, en absence de coenzyme, et cette interaction provoque un changement de conformation donnant une structure compacte à l'enzyme.

- Le NAD^+ assure une protection complète de la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase lorsque 2 équivalents du coenzyme sont liés à une mole d'enzyme. Ces données vont dans le sens de l'hypothèse émise par Conway et Koshland selon laquelle le maintien de la conformation dans l'enzyme de lapin est assuré uniquement par les deux premiers NAD^+ fixés, tandis que les deux derniers dont la constante de dissociation est beaucoup moins élevée, participent pour la plus grande part à la réaction catalytique.

- L'AMP en revanche sensibilise la deshydrogénase à l'égard de l'action de la chymotrypsine ; la constante apparente de dissociation AMP-enzyme est de

$K_{AMP} = 1,2 \cdot 10^{-4}$ M. L'activité arsenylante disparaît rapidement, tandis que les activités oxydante et estérasique sont maintenues. Son site de fixation est sans doute celui du noyau adénylique, puisque l'AMP peut déplacer le coenzyme et lever la protection apportée par deux équivalents de NAD^+ .

La méthode protéolytique nous a permis de mettre en évidence de faibles changements de conformation de la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase provoqués par divers effecteurs, et de déterminer des constantes de dissociation effecteurs-enzyme.

A partir de ces résultats concernant la protéolyse de la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase on peut conclure que :

- 1) tous les ligands capables de modifier la structure de l'enzyme modifient son comportement vis à vis de la protéolyse chymotrypsique,
- 2) la protéolyse dissocie séquentiellement trois activités importantes :
a/ phosphorylante, b/ oxydante, c/estérasique.

La présence d'AMP stabilise la fraction oxydante ; cela nous a permis d'améliorer considérablement le rendement en cette fraction à la suite d'une purification sur colonne de Séphadex G 100 et d'en étudier les propriétés essentielles.

Cette stabilisation montre que l'AMP doit interagir avec la fraction oxydante et la protéger au cours de la protéolyse.

L'activité estérasique est la fonction la plus simple que réalise la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase ; elle ne fait intervenir vraisemblablement qu'une attaque de la forme anionique d'un groupement sulfhydrile d'une cystéine active par sous-unité sur une liaison ester. C'est également l'activité la plus stable au cours de la dégradation par la chymotrypsine.

Les deux fonctions qui font sans doute intervenir le site de phosphorylation sont les activités phosphatasique et NADH-X ; elles ne sont plus

présentes dans la fraction oxydante. Par filtration sur gel de Séphadex G 100, on peut estimer son poids moléculaire à 65.000 ± 5.000 ; le coefficient de sédimentation du pic ainsi isolé est de $S_{20}^W = 4,4 \pm 0,2$. L'analyse des acides aminés de cette fraction met en évidence en particulier la présence de huit cystéines et de quatre tryptophanes. Le centre actif de chaque sous-unité comporte deux cystéines distantes seulement de quatre résidus qui ne sont pas susceptibles d'être touchés par la protéolyse chymotrypsique. D'autre part l'oxydation par l'iodosobenzoate entraîne la disparition de tous les groupements sulfhydriles réduits et inactive l'enzyme. La réversibilité de cette réaction plaide en faveur de la formation de quatre ponts disulfures intramoléculaires et de l'existence de quatre centres actifs par mole de fraction oxydante.

L'effet du NAD^+ sur son émission de fluorescence confirme ce résultat : le quenching de la fluorescence atteint sa valeur maximale lorsque quatre équivalents de coenzyme interagissent avec la fraction oxydante ; les résidus tryptophanes (un par sous-unité) devraient être responsables de cet effet dans la fraction oxydante et dans l'enzyme natif. Cependant le NAD^+ ne provoque sans doute plus de changement important dans la conformation de l'enzyme, car il ne fait plus apparaître d'effet Cotton extrinsèque entre 270 et 300 nm.

Ainsi l'analyse des propriétés de la fraction oxydante permet de montrer quelles sont les activités liées à la présence du site de phosphorylation (NADH-X et phosphatasique), celle qui n'exige que l'interaction entre le NAD^+ et le centre catalytique pour réaliser une réaction de transacylation (activité oxydante) ; celle enfin qui ne nécessite que la présence de la cystéine du centre actif (activité estérasique).

Cette étude nous ouvre encore actuellement beaucoup de perspectives.

- L'analyse de la structure de la fraction oxydante, reliée à ses propriétés catalytiques et physico-chimiques pourrait en particulier nous permettre de déterminer 1) quel est le tryptophane responsable du phénomène de quenching d'émission de fluorescence lorsque le NAD^+ interagit avec la GPDH, 2) si la lysine 181 est toujours présente dans la fraction oxydante, et si elle est encore réactive.
- L'étude de l'influence de différents ligands (AMP cyclique 3'5', NMN, 2-aniline naphthalène-8-sulfonate (ANS)) sur les propriétés de cette fraction pourrait permettre de préciser la nature de l'interaction NAD^+ enzyme et de voir si cette interaction entraîne encore des changements décelables dans la conformation de l'enzyme.

Il serait intéressant de déterminer les constantes de dissociation pour chaque NAD^+ lié à la fraction oxydante, car les résultats obtenus pour le K_m et le K_D déduit du phénomène de quenching de l'émission de fluorescence nous amènent à envisager la possibilité d'un phénomène de coopérativité négative en ce qui concerne l'interaction fraction oxydante - NAD^+ .

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - Hess dans "Control of Energy metabolism", édité par B. Chance,
R. W. Estabrook et J. R. Williamson, (1965) p. 143.
- 2 - W. F. Harrington et G. M. Karr,
J. Mol. Biol., 13 (1965) 885.
- 3 - B. E. Davidson, M. Sajgo, H. F. Noller et J. I. Harris,
Nature, 216 (1967) 23.
- 4 - J. I. Harris in Advanced study Institute on Pyridine nucleotide-
Dehydrogenases, Constance (Allemagne) Septembre 1969.
- 5 - W. S. Allison et N. O. Kaplan,
J. Biol. Chem., 239 (1964) 2140.
- 6 - H. C. Watson et L. J. Banaszack,
Nature, 204 (1964) 918.
- 7 - O. P. Chilson, G. B. Kitto, J. Pudles et N. O. Kaplan,
J. Biol. Chem., 241 (1966) 2431.
- 8 - O. J. Koeppe, P. D. Boyer et M. P. Stulberg,
J. Biol. Chem., 219 (1956) 569.
- 9 - S. F. Velick et J. E. Hayes,
J. Biol. Chem., 203 (1953) 545.
- 10 - E. Racker,
Physiol. Rev., 35 (1955) 1.
- 11 - E. Racker et I. Krimsky,
Science, 122 (1955) 319.
- 12 - I. Krimsky et E. Racker,
Biochemistry, 2 (1963) 512.
- 13 - O. J. Koeppe, P. D. Boyer et D. S. Sheppard,
Federation Proc., 18 (1959) 263.
- 14 - A. L. Murdoch et O. J. Koeppe,
J. Biol. Chem., 239 (1964) 1983.

- 15 - L. Rapkine,
Biochem. J., 32 (1938) 1729.
- 16 - I. Krimsky et E. Racker,
Federation Proc., 14 (1955) 239.
- 17 - I. Krimsky et E. Racker,
Federation Proc., 17 (1958) 1135.
- 18 - W. S. Allison et J. I. Harris,
Second FEBS Meeting, Vienne, 1965, A205, 140.
- 19 - W. S. Allison,
Annals of the New York Academy of Science, vol. 151 (1958) 180.
- 20 - E. Racker et I. Krimsky,
Nature, 169 (1952) 1043.
- 21 - B. Chance et J. H. Park,
J. Biol. Chem., 242 (1967) 5093.
- 22 - K. Kirschner, M. Eigen, R. Bittman et B. Voigt,
Proc. Natl. Acad. Sci., U. S., 56 (1966) 1661.
- 23 - J. J. M. de Vijlder et E. C. Slater,
Biochim. Biophys. Acta, 167 (1968) 23.
- 24 - J. J. M. de Vijlder, W. C. Boers et E. C. Slater,
Biochim. Biophys. Acta, 191 (1969) 214.
- 25 - S. F. Velick,
J. Biol. Chem., 233 (1958) 1455.
- 26 - T. Keleti,
Biochem. Biophys. Res. Comm., 30 (1968) 185.
- 27 - I. Listowski, C. S. Furfine, J. J. Betheil et S. England,
J. Biol. Chem., 240 (1965) 4253.
- 28 - I. A. Bolotina, D. S. Markovich, M. V. Volkenstein et P. Zavodsky,
Biochim. Biophys. Acta, 132 (1967) 260.



- 29 - R. Jaenicke et W.B. Gratzler,
European J. Biochem., 10 (1968) 158.
- 30 - A. Conway et D. E. Koshland,
Biochemistry, 7 (1968) 4011.
- 31 - D. E. Koshland et R. A. Cook,
"Advances study institute on pyridine nucleotide dependent dehydrogenases"
Constance (1969).
- 32 - S. F. Velick,
J. Biol. Chem., 203 (1953) 563.
- 33 - A. Stockell,
J. Biol. Chem., 234 (1959) 1286.
- 34 - B. Chance et J. Harting,
Fed. Proc., 12 (1953) 188.
- 35 - J. Harting et B. Chance,
Fed. Proc., 12 (1953) 714.
- 36 - B. Chance dans W. D. Mc Elroy et B. Glass (Editeurs) "Mechanism of
enzyme action", Johns Hopkins Press, Baltimore, 1954, p. 399.
- 37 - E. Racker, et I. Krimsky,
J. Biol. Chem., 198 (1952) 731.
- 38 - E. M. Kosower,
J. Am. Chem. Soc., 78 (1956) 3497.
- 39 - E. M. Kosower, dans "Flavins and Flavoproteins"(BBA Library, vol. 8),
édité par E. C. Slater, Elsevier, Amsterdam, 1966, p. 1.
- 40 - G. Stancel et W. C. Deal Jr.,
Biochem. Biophys. Res. Comm., 31 (1968) 398.
- 41 - Shih Tzy Yang et W. C. Deal Jr.,
Biochemistry, 8 (1969) 2806.
- 42 - Shih Tzy Yang et W. C. Deal Jr.,
Biochemistry, 8 (1969) 2814.
- 43 - S. M. Constantidinès et W. C. Deal Jr.,
J. Biol. Chem., 244 (1969) 5695.

- 44 - N.K. Nagradova, M.K. Vorona et P.A. Asrijanz,
Biokhymia, 34 (1969) 627.
- 45 - M. Sapag-Hagar,
Revista Espagnola de Fisiologia, 25 (1969) 201.
- 46 - L. Polgär,
Experientia, 22 (1966) 232.
- 47 - J. Harting et S.F. Velick,
Fed. Proc., 12 (1953) 714.
- 48 - T.E. Smith,
Biochemistry, 5 (1966) 2919.
- 49 - W.S. Allison, M.J. Connors et D.J. Parker,
Biochem. Biophys. Res. Comm., 34 (1969) 503.
- 50 - J.J.M. de Vijlder, A.G. Hilvers, J.M.J. Van Lis et E.C. Slater,
Biochim. Biophys. Acta, 191 (1969) 221.
- 51 - J. Teipel et D.E. Koshland Jr.,
Biochim. Biophys. Acta, 198 (1970) 183.
- 52 - J.H. Park, B.P. Meriwether, P. Clodfelder et L.W. Cunningham,
J. Biol. Chem., 236 (1961) 136.
- 53 - N.T.A. Behme et E.H. Cordes,
J. Biol. Chem., 242 (1967) 5500.
- 54 - R.N. Lindquist et E.H. Cordes,
J. Biol. Chem., 243 (1968) 5837.
- 55 - E.J. Olson et J.H. Park,
J. Biol. Chem., 239 (1964) 2316.
- 56 - E. Taylor, B.P. Meriwether et J.H. Park,
J. Biol. Chem., 238 (1963) 734.
- 57 - E. Mathew, B.P. Meriwether et J.H. Park,
J. Biol. Chem., 242 (1967) 5024.
- 58 - R.N. Perham et J.I. Harris,
J. Mol. Biol., 7 (1963) 316.

- 59 - A.H. Gold et H. L. Segal,
Biochemistry, 3 (1964) 778.
- 60 - B.S. Hartley et B.A. Kilby,
Biochem. J., 56 (1954) 288.
- 61 - S. Halcomb, J.S. Bond, R. Kloeper et J.H. Park,
Fed. Proc., 27 (1968) Abstract n°435, p. 292.
- 62 - J.S. Bond, S.H. Francis et J. Harting Park,
J. Biol. Chem., 215 (1970) 1041.
- 63 - J. Ovadi et T. Keleti,
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., 4(1969) 365.
- 64 - J.H. Park et D.E. Koshland Jr.,
J. Biol. Chem., 233 (1958) 986.
- 65 - R. Ehrling et P. Colowick,
J. Biol. Chem., 244 (1969) 4589.
- 66 - B.E. Davidson,
Eur. J. Biochem., 14 (1970) 545.
- 67 - F. Traoré,
Résultats non publiés (Thèse de 3e Cycle, Faculté des Sciences d'Orsay,
Juillet 1970.
- 68 - G.W. Rafter, S. Chaykin et E.G. Krebs,
J. Biol. Chem., 208 (1954) 799.
- 69 - A.G. Hilvers, J.H. M. Weenen et K. Van Dam,
Biochim. Biophys. Acta, 128 (1966) 74.
- 70 - D.E. Griffith et R.A. Chaplain,
Biochem. Biophys. Res. Comm., 8 (1962) 501.
- 71 - J.A. Barltrop, P.W. Grubb et B. Hesp,
Nature, 199 (1963) 759.
- 72 - S.P.A. Alivisatos, F. Ungar, G.J. Abraham,
Biochemistry, 4 (1965) 2616.
- 73 - A.G. Anderson Jr et G. Berkelhammer,
J. Am. Chem. Soc., 80 (1958) 992.

- 74 - R. M. Burton et N. O. Kaplan,
Arch. Biochem. Biophys., 101 (1963) 150.
- 75 - T. Keleti et M. Telegdi,
Act. Physiol. Acad. Sci. Hung., 17 (1960) 141.
- 76 - G. W. Rafter et S. P. Colowick,
Arch. Biochem. Biophys., 66 (1957) 190.
- 77 - J. I. Harris et L. Polgär,
J. Mol. Biol., 14 (1965) 630.
- 78 - L. Polgär,
Biochim. Biophys. Acta, 118 (1966) 276.
- 79 - G. T. Cori, M. W. Slein et C. F. Cori,
J. Biol. Chem., 173 (1948) 605.
- 80 - C. Gros et B. Labouesse,
Eur. J. Biochem., 7 (1969) 463.
- 81 - J. F. Taylor, A. A. Green et G. T. Cori,
J. Biol. Chem., 173 (1948) 591.
- 82 - G. Beisenherz, T. Bücher et K. H. Garbade, dans S. P. Colowick et
N. O. Kaplan, "Methods in Enzymology", Vol. I, Academic Press,
New York, 1955, p. 391.
- 83 - J. B. Fox et W. B. Dandliker,
J. Biol. Chem., 221 (1956) 1005.
- 84 - F. Lipmann et L. C. Tuttle,
J. Biol. Chem., 159 (1945) 21.
- 85 - L. Berenblum et E. Chain,
Biochem. J., 32 (1938) 295.
- 86 - V. Henri,
Compt. Rendus Acad. Sci., Paris, 135 (1902) 916.
- 87 - L. Michaelis et M. L. Menten,
Biochem. Z., 49 (1913) 333.



- 38 - H. Lineweaver et O. Burk,
J. Am. Chem. Soc., 56 (1934) 658.
- 89 - G. L. Ellman,
Arch. Biochem. Biophys., 82 (1959) 70.
- 90 - P. H. W. Butterworth, H. Baum et S. W. Porter,
Arch. Biochem. Biophys., 118 (1967) 716.
- 91 - V. Meyer et W. Wachter,
Ber. 25 (1892) 2632.
- 92 - D. J. Parker et W. S. Allison,
J. Biol. Chem., 244 (1969) 180.
- 93 - G. W. Rafter,
Arch. Biochem. Biophys., 67 (1957) 267.
- 94 - S. Moore et W. Stein,
J. Biol. Chem., 211 (1954) 907.
- 95 - E. S. West et R. E. Rinehart,
J. Biol. Chem., 146 (1942) 105.
- 96 - A. F. S. A. Habeeb,
Anal. Biochem., 14 (1966) 328.
- 97 - T. Okuyama et K. Satake,
J. Biochem., 47 (1960) 454.
- 98 - K. Satake, T. Okuyama, M. Chashi et T. Shinoda,
J. Biochem., 47 (1960) 654.
- 99 - A. Kotaki, M. Harada et K. Yagi,
J. Biochem. Tokyo, 55 (1964) 553.
- 100 - T. W. Goodwin et R. A. Morton,
Biochem. J., 40 (1946) 628.
- 101 - A. Patchornik, W. B. Lawson et B. Witkop,
J. Am. Chem. Soc., 80 (1958) 4747.

- 102 - A. Patchornik, W.B. Lawson, E. Gross et B. Witkop,
J. Am. Chem. Soc., 82 (1960) 5923.
- 103 - T. Viswanatha et W.B. Lawson,
Arch. Biochem. Biophys., 93 (1961) 130.
- 104 - T.F. Spande et B. Witkop, dans S.P. Colowick et N.O. Kaplan,
"Methods in Enzymology" édité par C.H.W. Hirs, Academic Press,
New York and London, Vol. XI, p. 498 (1967).
- 105 - T. Svedberg et K.O. Pedersen,
"The Ultracentrifuge" Oxford Un. Press, London and New York,
Johnson Reprint Corporation, New York.
- 106 - Magar E. Magar,
J. Biol. Chem., 242 (1967) 2517.
- 107 - N.S. Simmons, C. Cohen, A.G. Szent-Györgyi, D.B. Wetlaufer et
E.R. Blout,
J. Am. Chem. Soc., 83 (1961) 4766.
- 108 - W. Moffit et J.T. Yang,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 42 (1956) 596.
- 109 - I. Harris et R.W. Perham,
Abstracts Sixth International Congress of Biochem., 1964, I.U.B.,
Vol. 32, p. 293, IV, 527.
- 110 - G.D. Fasman, dans S.P. Colowick et N.O. Kaplan (Editeurs)
Methods in Enzymology, Vol. 6, Academic Press Inc., New York,
(1963), p. 928.
- 111 - E.R. Blout, J.P. Carver et E. Shechter, dans "Optical Rotatory
dispersion of polypeptides and proteins", G. Snatzke, Editeur,
publié par Heyden et Fils, Londres (1965) p. 224.
- 112 - G.T. Schwert et Y. Takenaka,
Biochim. Biophys. Acta, 159 (1955) 570.

- 113 - A. Fenselau,
Biochem. Biophys. Res. Comm., 40 (1970) 481.
- 114 - B. Cantau, C. Brunel et J. Pudles,
Biochim. Biophys. Acta, 167 (1968) 511.
- 115 - B. Cantau, G. Jaureguiberry et J. Pudles,
Eur. J. Biochem., 16 (1970) 208.
- 116 - G. Jacobs et L. W. Cunningham,
Biochemistry, 7 (1968) 143.
- 117 - R. C. Adelman, R. C. Morse, D. E. Chan W. et B. L. Horecker,
Arch. Biochem. Biophys., 126 (1968) 343.
- 118 - M. J. Adams, A. Mc. Pherson Jr., M. G. Rossmann, R. W. Schevitz et
A. J. Wonacott,
J. Mol. Biol., 51 (1970) 31.
- 119 - A. Mc. Pherson Jr.,
J. Mol. Biol., 51 (1970) 39.
- 120 - J. D. Shore,
Biochemistry, 8 (1969) 1588.
- 121 - M. L. Bender, F. J. Kezdy et F. C. Wadler,
J. of Chem. Education, 44 (1967) 84.
- 122 - L. A. Fahien,
J. Biol. Chem., 241 (1966) 4115.
- 123 - T. Keleti,
Advanced Study on Pyridine nucleotide-dependent dehydrogenases,
Constance, Septembre 1969, II - 9.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

- Propriétés générales de la GPDH	1
I - Structure, poids moléculaire, sous-unités	
II - Etude du centre actif	
1) Rôle de la cystéine	
2) Interaction NAD^+ -Enzyme	
III - Fonctions catalytiques	8
1) Oxydation phosphorylante	9
2) Activité estérasique	11
3) Activité phosphatasique	13
4) Activité NADH-X	15
IV - Transfert $\text{S} \longrightarrow \text{N}$	17
V - Conclusion	17

CHAPITRE I - Matériel et Méthodes

- Matériel	22
- Méthodes	
I - Préparations	
A - Phases essentielles de la préparation de la GPDH	23
B - Préparation du G-3-P	24
C - Préparation de l'apoenzyme	25
II - Méthodes enzymatiques	
A - Tests enzymatiques des réactions de transacylation	27
B - Activité estérasique	28
C - Activité phosphatasique	29
D - Activité NADH-X	31
E - Détermination des constantes cinétiques	

III - Méthodes chimiques	
1) Modification des groupements sulfhydriles	33
a/ par l'acide dithiobis-nitrobenzoïque	
b/ par l'acide o-iodosobenzoïque	
2) Dosage des groupements $-NH_2$ libres	35
a/ par la méthode de Moore et Stein	
b/ par la méthode de Habeeb (trinitrophénylation)	
c/ Dosage des $-NH_2$ terminaux	
3) Dosage des tryptophanes et des tyrosines par la méthode de Goodwin et Morton	37
4) Marquage du tryptophane par le N-bromosuccinimide ...	38
IV - Méthodes Physico-chimiques	
1) Ultracentrifugation	39
2) Fluorimétrie	40
3) Dispersion rotatoire optique	41
CHAPITRE II - Résultats	
I - Mise au point des conditions de la protéolyse	43
A - Mesure de la vitesse de protéolyse	
B - Concentration en chymotrypsine	
C - Stabilité de l'activité oxydante de l'enzyme protéolysé.	
II - Protéolyse de la GPDH, Propriétés ; obtention de la fraction oxydante	46
A - Protéolyse de l'apoenzyme	
1) Variation des activités en fonction du temps	
2) Variation des activités en fonction des liaisons peptidiques rompues et des peptides solubles dans $HClO_4$ 3%	
3) Dosage des groupements sulfhydriles par le DTNB	

4) Variation de l'émission de fluorescence au cours de la protéolyse	
B - Effet des ligands et de l'IOB sur la protéolyse et les propriétés physicochimiques de la GPDH	
1) Effet des ligands sur la protéolyse	49
- Effet des substrats	
- Effet des nucléotides	
2) Effet des ligands sur les propriétés physicochimiques de la GPDH	52
a/ Fluorescence	
b/ Dispersion rotatoire	
- Discussion	53
III - Démonstration de l'existence d'une nouvelle fraction protéique de haut poids moléculaire, formée au cours de la protéolyse	57
1) Méthodes analytiques	
2) Isolement préparatif	
3) Rendement en fraction oxydante	
4) Homogénéité de la fraction oxydante	
IV - Propriétés de la fraction oxydante	
A - Analyse préliminaire des acides aminés	62
B - Propriétés enzymatiques	62
1) Activité oxydante	
a/ Constante de Michaelis-Menten pour le NAD^+ et le D-glycéraldéhyde	
b/ Effet de l'AMP sur l'activité oxydante	
2) Activité estérasique	64
3) Activité phosphatasique	64
4) Activité NADH-X	66

C - Propriétés physico-chimiques	66
1) Emission de fluorescence	
2) Dispersion rotatoire	
- Discussion	67
CHAPITRE III - CONCLUSION	75
BIBLIOGRAPHIE	80

